

# Quantitative Beobachtung dynamischer Prozesse im frühen C. elegans Embryo

Von der Universität Bayreuth  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

von

**Dipl.-Phys. Philipp Ulrich Struntz**

geboren in Münchberg, Deutschland

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiss
2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Köhler

Tag der Einreichung: 27.04.2018  
Tag des Kolloquiums: 26.07.2018

---

---

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse mithilfe moderner Lichtmikroskopietechniken. Der Fokus liegt hierbei auf der Embryogenese des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*. Hierfür wird ein bereits vorhandener Aufbau eines Lichtblattmikroskops weiterentwickelt, charakterisiert und zur Durchführung schonender dreidimensionaler Langzeitaufnahmen der frühen Embryogenese eingesetzt. Die aus den so ermöglichten Aufnahmen resultierenden Ergebnisse einer weiteren Promotionsarbeit werden kurz vorgestellt. Eine Erweiterung des Aufbaus zur Durchführung von Diffusionsmessungen ermöglicht den Vergleich von drei unterschiedlichen Messtechniken (SPIM-FCS, SPT, DDM) an Eichproben. Darauf aufbauend erfolgt eine räumliche und zeitliche Quantifizierung der Proteindiffusion in lebenden Embryonen. Nach ersten erfolgreichen Messungen an einem peripheren Membranprotein im Zytoplasma und auf der Zellmembran des Embryos wird die Entwicklung eines für die Embryonalentwicklung kritischen räumlichen Proteindiffusionsgradienten verfolgt.

In einem anschließenden Teil der Arbeit wird die Entwicklung, die Konstruktion und die Charakterisierung eines zweiten Aufbaus zur Durchführung von höchstauflösenden Mikroskopieaufnahmen sowie von Bleich- und Ablationsexperimenten vorgestellt. Neben der Auflösungsverbesserung mikroskopischer Aufnahmen wird hierdurch sowohl die Quantifizierung von Diffusions- und Bindungsprozessen als auch eine minimalinvasive Möglichkeit zur gezielten Probenmanipulation ermöglicht. Somit können neue Fragestellungen und relevante Schlüsselprozesse während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Die Methoden werden an Kulturzellen und Wurmembryonen getestet und erste Ergebnisse vorgestellt.

## Summary

*The topic of this thesis is the study of developmental biological processes using modern light microscopy techniques. The focus is on the embryogenesis of the nematode *Caenorhabditis elegans*. For this purpose, an already existing setup is refined, characterized and used for gentle three-dimensional long-term imaging of the early embryogenesis. The results of another thesis, which were made possible by these acquisitions, are briefly presented. An extension of the setup to perform diffusion measurements enables a comparison of three different measurement techniques (SPIM-FCS, SPT, DDM) using calibration samples. Based on these first results, a subsequent spatial and temporal quantification of protein diffusion in living embryos is performed. After first successful measurements on a peripheral membrane protein in the cytoplasm and on the membrane of the embryo, the development of a spatial diffusion gradient of a protein, which is critical for the embryonic development, is examined.*

*In a subsequent part of this thesis the development, construction and characterization of a second setup for super-resolution microscopy as well as bleaching and ablation measurements is presented. In addition to the gain of resolution these techniques facilitate both the quantification of diffusion and binding processes and a minimally invasive method for specific sample manipulations. As a result of this, new issues and relevant key processes in the embryonic development can be explored. The methods are tested on culture cells and worm embryos and first results are presented.*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>I. Grundlagen</b>	<b>13</b>
<b>2. Biologischer Kontext</b>	<b>14</b>
2.1. Die eukaryontische Zelle . . . . .	14
2.2. Der Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .	16
2.3. Diffusion in lebenden Zellen . . . . .	21
<b>3. Methoden</b>	<b>25</b>
3.1. Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	25
3.2. Messtechniken zur Diffusionsmessung . . . . .	37
3.3. Laser-Ablation . . . . .	47
<b>II. Weiterentwicklung und Einsatz eines Lichtblattmikroskops</b>	<b>51</b>
<b>4. SPIM-Aufbau</b>	<b>52</b>
4.1. Hardware-Setup . . . . .	53
4.2. Aufbauansteuerung, Kontroll- und Evaluationssoftware . . . . .	56
4.3. Aufbaucharakterisierung . . . . .	58
4.4. Zweiter SPIM-Aufbau . . . . .	62
<b>5. Aufnahmen der frühen Embryogenese von <i>C. elegans</i></b>	<b>66</b>
5.1. Methoden . . . . .	67
5.2. Untersuchung der Zelltrajektorien und mechanisches Modell . . . . .	69
5.3. Vermessung der Zellvolumina und Teilungszeiten . . . . .	71
5.4. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	74
<b>6. Techniken zur Diffusionsmessung in einem Lichtblattmikroskop</b>	<b>76</b>
6.1. SPIM-FCS . . . . .	76
6.2. Single Particle Tracking . . . . .	90
6.3. Differential Dynamic Microscopy . . . . .	97
6.4. Zusammenfassung, Vergleich und Ausblick . . . . .	109
<b>7. Diffusionsmessungen im frühen Wurmembryo mit SPIM-FCS</b>	<b>111</b>
7.1. Messungen am peripherem Membranprotein PLC1 $\delta$ 1 . . . . .	111
7.2. Verfolgung der Diffusionsgradientenentwicklung von PIE-1 . . . . .	119



---

<b>III. Entwicklung und Einsatz eines SD-FRAP-Ablations-Aufbaus</b>	<b>129</b>
<b>8. SD-FRAP-Ablations-Aufbau</b>	<b>130</b>
8.1. Hardware-Setup . . . . .	130
8.2. Aufbauansteuerung, Kontrollsoftware und Datenverarbeitung . . . . .	134
8.3. Kalibration und Aufbaucharakterisierung . . . . .	137
<b>9. Anwendungen</b>	<b>143</b>
9.1. ISM-Aufnahmen . . . . .	144
9.2. FRAP-Messungen . . . . .	156
9.3. Ablationsexperimente . . . . .	165
<b>IV. Zusammenfassung</b>	<b>179</b>
<b>10. Fazit und Ausblick</b>	<b>180</b>
<b>V. Appendix</b>	<b>183</b>
<b>A. Beispielkurven</b>	<b>184</b>
<b>B. Erläuterungen zur Kontrollsoftware</b>	<b>185</b>
<b>C. Verwendete Bauteile in den Aufbauten</b>	<b>192</b>
<b>D. Bilder der Aufbauten</b>	<b>198</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>201</b>
<b>Publikationen und Konferenzbeiträge</b>	<b>216</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>218</b>

---

## Verwendete Abkürzungen:

- **AOTF:** *acousto-optical tunable filter*
- **AP-Achse:** Anterior-Posterior-Achse
- **ATP:** Adenosintriphosphat
- **BFP:** *back focal plane*
- **CEF:** *collection efficiency function*
- **C. elegans:** *Caenorhabditis elegans*
- **CGC:** *Caenorhabditis Genetics Center*
- **CHO-Zellen:** *Chinese Hamster Ovary-Zellen*
- **CLSM:** *confocal laser scanning microscope*
- **CW:** *continuous wave*
- **DDM:** *differential dynamic microscopy*
- **DNA:** *deoxyribonucleic acid*
- **DPSS-Laser:** *diode-pumped solid-state laser*
- **DSLM:** *digital scanned light-sheet microscopy*
- **ER:** endoplasmatisches Retikulum
- **FCS:** *fluorescence correlation spectroscopy*
- **FFT:** *fast-fourier-transformation*
- **FLIP:** *fluorescence loss in photobleaching*
- **FPGA:** *field programmable gate array*
- **FRAP:** *fluorescence recovery after photobleaching*
- **FWHM:** *full width at half maximum*
- **GFP:** *green fluorescent protein*
- **HeLa-Zellen:** menschliche Gebärmutterhalskrebszellen von Henrietta Lacks
- **IC:** *intersystem-crossing*
- **ISF:** *image structure function*
- **ISM:** *image scanning microscopy*
- **LSFM:** *lightsheet-fluorescence microscope*
- **MDE:** *molecular detection efficiency*
- **MSD:** *mean square displacement*

- 
- **NA:** Numerische Apertur
  - **NEBD:** *nuclear envelope breakdown*
  - **PSF:** Punktspreizfunktion
  - **ROI:** *region of interest*
  - **sCMOS:** *scientific complementary metal-oxide-semiconductor*
  - **SD-Mikroskopie:** Spinning-Disk-Mikroskopie
  - **SPIM:** *single / selective plane illumination microscope*
  - **SPT:** *single particle tracking*

### Häufig verwendete Größen:

- Sensorsignal:  $I$
- Teilchenanzahl:  $N$
- Teilchenanzahlkonzentration:  $C$
- Zeitabstand:  $\tau$
- Längenskala für Abfall auf  $1/e^2$ :  $\sigma$  (mit  $\sigma = \frac{\text{Halbwertsbreite}}{\sqrt{2 \cdot \ln(2)}}$ )
- Detektions-PSF:  $\text{PSF}_{\text{Det}}$
- Anregungs-PSF:  $\text{PSF}_{\text{Anr}}$
- *Pinhole*-Funktion:  $A$
- *collection efficiency function*: CEF (Faltung aus  $\text{PSF}_{\text{Det}}$  und  $A$ )
- *molecular detection efficiency*: MDE (Faltung aus  $\text{PSF}_{\text{Anr}}$  und CEF)

---

---

## 1. Einleitung

*"But I've never seen the Icarus story as a lesson about the limitations of humans.  
I see it as a lesson about the limitations of wax as an adhesive."  
- Randall Munroe [1]*

Der durchschnittliche Leser dieser Arbeit besteht aus ca.  $3,72 \cdot 10^{13}$  Zellen [2]. Angefangen haben vermutlich alle mit einer einzelnen Eizelle und einem Spermium. Die Entstehung von Lebewesen bzw. der Weg von einer ersten befruchteten Eizelle zu einem überlebensfähigen multizellulären Organismus stellt hierbei eine der grundlegenden Fragen der Menschheit dar und steht somit schon seit langem im Fokus wissenschaftlicher Forschung.

Erste bekannte Schriftstücke über die Untersuchung der Embryogenese stammen bereits aus der Feder von Hippocrates (460 – 370 v.Chr.) und Aristoteles (384 – 322 v.Chr.) [3, 4]. Letzterer beschrieb in seinem Werk *De generatione animalium* seine Ergebnisse aus Beobachtungen an sich entwickelnden Vogeleiern und der Sezierung von Embryonen unterschiedlicher Spezies. Aristoteles entwickelte auf diesen basierend bereits erste Ansätze der heutzutage anerkannten Theorie der Epigenese, also der Idee, dass sich Strukturen bei der Entwicklung eines Lebewesens aus einer zunächst ungeformten Materie formen. Dem gegenüber stand noch bis ins frühe 19. Jahrhundert der Ansatz der Präformationslehre, innerhalb derer die Entwicklung eines Lebewesens aus einer bereits ausgebildeten Miniaturversion (wahlweise im Spermium oder der Eizelle befindlich) beginnt und der Embryo in seiner Entwicklung nur noch weiter wächst [4].

Die Untersuchung und das Erlangen neuer Erkenntnisse über die Entstehung von Lebewesen war hierbei auch immer begleitet und abhängig vom technischen Fortschritt. Durch den Einsatz erster optischer Linsen konnte William Harvey im 17. Jahrhundert durch Beobachtungen an Hühnereiern den Ursprung des Embryos im Blastoderm beschreiben. Die im 17. Jahrhundert stärker aufkommende Mikroskopie ermöglichte auch erste Forschungen an Spermien. Weitere mikroskopische Untersuchungen Ende des 18. Jahrhunderts führten unter anderem zur Widerlegung der Präformationslehre durch die Beschreibung der Embryogenese eines Hühnerembryos von Caspar Friedrich Wolff. Dies wurde unterstützt durch die Entdeckung der Keimblätter und der menschlichen Eizelle durch Heinz Christian Pander und Karl Ernst von Baer Anfang des 19. Jahrhunderts. Erste Erkenntnisse in dem Bereich der Genetik in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts, beginnend mit den Arbeiten von Gregor Mendel und der Entdeckung der DNA durch Friedrich Miescher und Richard Altmann, führten mit weiteren Fortschritten auf den Gebieten der Molekularbiologie schließlich zur Entstehung der Entwicklungsbiologie [5] und einem vollständigerem Bild der beteiligten Prozesse.

Untersuchungsgegenstände der Entwicklungsbiologie sind Wachstums- und Entwicklungsmechanismen von Organismen, wie die der Zelldifferenzierung und der Morphogenese. Prozesse der Musterbildung und Selbstorganisation wurden hierbei durch Alan Turing bereits 1952 mithilfe eines Reaktions-Diffusionsmodells beschrieben [6]. Weiterentwicklungen auf dem Feld der Fluoreszenzmikroskopie und die Entdeckung fluoreszenter Proteine im Jahr 1962 durch Osamu Shimomura [7] führten zur erstmaligen Verwendung solcher Proteine zur Fluoreszenzmarkierung von anderen Proteinen in lebenden Proben durch Douglas Prasher 1994 [8]. Dies ermöglichte mikroskopische Aufnahmen der Proteinexpression während der Embryogenese von Organismen. Zahlreiche Fortschritte und Neuentwicklungen fluoreszenzmikroskopischer und molekulargenetischer Techniken, beginnend ab der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, führten so zu einer Vielzahl an heutigen Untersuchungsmöglichkeiten und einem besseren Verständnis der Embryogenese unterschiedlichster Organismen.

Als hochgradig interdisziplinäre Forschungsrichtung verlangt die Entwicklungsbiologie hierbei neben der Anwendung biologischer und biochemischer Ansätze auch insbesondere die Berücksichtigung physikalischer Konzepte. Die Möglichkeit, komplexe biologische Prozesse auf ein

mathematisches Modell zu reduzieren und daraus abgeleitete Vorhersagen experimentell zu überprüfen, hilft hier zudem bei der Suche nach den relevanten Faktoren und Prozessen im biologischen System. Des Weiteren sind eine Reihe an physikalischen Aspekten, wie beispielsweise solche der Thermodynamik, der statistischen Physik und der Mechanik, für das Verständnis des Zusammenspiels von Proteinen in Zellen und der Wechselwirkung zwischen Zellen relevant. Insbesondere der Diffusion, als wichtigster passiver Transportprozess von Proteinen in Zellen, kommt dabei eine kritische Bedeutung bei der Untersuchung dynamischer Prozesse in einem Organismus zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung zweier fluoreszenzmikroskopischer Versuchsaufbauten zur Untersuchung dynamischer Prozesse während der Embryogenese. Als Untersuchungsgegenstand wird hierbei der Fokus auf eines der relevanten Modellsysteme der Entwicklungsbiologie, den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, gelegt. Neben der Durchführung von schonenden, dreidimensionalen Langzeitaufnahmen an lebenden Embryonen sollen zudem unterschiedliche quantitative Techniken zur Diffusionsmessung implementiert und getestet werden. Des Weiteren ist der Einsatz einer Technik zur Auflösungssteigerung mittels strukturierter Beleuchtung sowie die Realisierung von Bleich- und Ablationsmessungen geplant. Letztere sollen gezielte minimalinvasive Eingriffe in die Entwicklung von Embryonen ermöglichen, um die aus den vorherigen Untersuchungen abgeleiteten Vorhersagen unter veränderten Randbedingungen testen zu können.

### Übersicht der Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit werden zunächst die biologischen Grundlagen der untersuchten Proben sowie der grundlegende theoretische Hintergrund der im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Methoden behandelt.

Daran anschließend wird in Teil II die Weiterentwicklung und Charakterisierung eines Lichtblattmikroskops sowie der Einsatz des Aufbaus zur Untersuchung der frühen Embryogenese behandelt. Neben ersten Forschungsergebnissen aus Langzeitaufnahmen der frühen Embryogenese von Wurmembryonen werden die Implementierungen der zuvor vorgestellten Techniken zur Diffusionsmessung beschrieben und die Ergebnisse von Messungen an Eichproben für die unterschiedlichen Methoden verglichen. Dieser Teil der Arbeit schließt mit Diffusionsmessungen in lebenden Embryonen.

Teil III der Arbeit beschreibt die Entwicklung, die Konstruktion und die Charakterisierung eines neuen Aufbaus zur Erstellung höchstauflösender Mikroskopieaufnahmen mit der zusätzlichen Möglichkeit der Durchführung von Bleich- und Ablationsexperimenten. Daran anschließend erfolgt eine methodenspezifische Beschreibung der konkreten Realisierungen am Aufbau und die Vorstellung erster ausgewählter Messungen an fixierten und lebenden biologischen Proben.

Die Arbeit schließt mit einem Fazit der Ergebnisse dieser Arbeit und einem kurzem Ausblick auf zukünftige Projekte.

---



---

# Teil I.

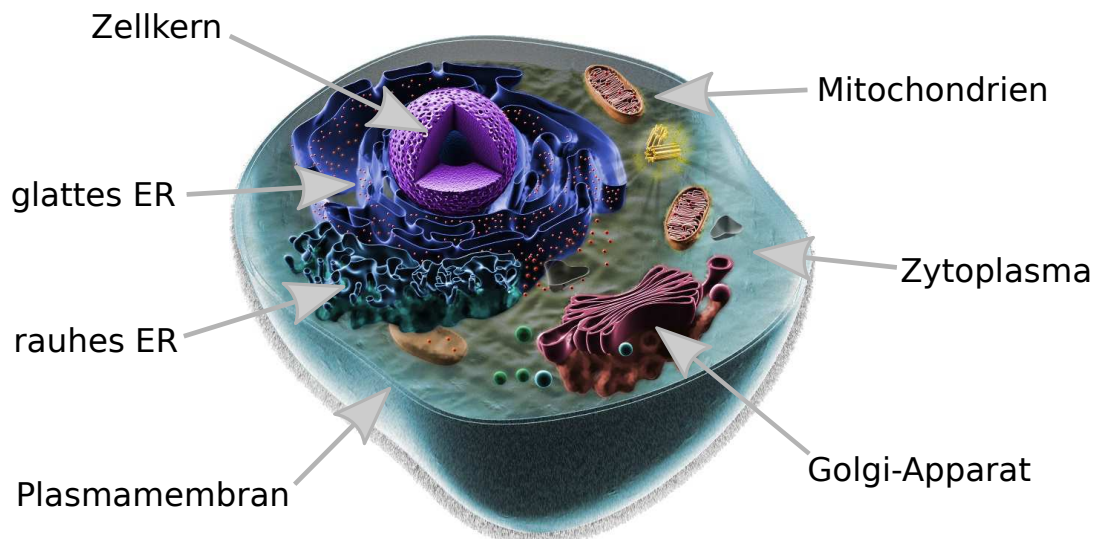
## Grundlagen

## 2. Biologischer Kontext

*Zu Beginn dieses Kapitels wird zunächst eine kurze Einführung in die verwendeten Proben der eukaryontische Zelle und des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* gegeben. Das Kapitel schließt mit einer Einführung in den theoretischen Hintergrund des untersuchten Prozesses der Diffusion in ihrem biologischen Kontext.*

### 2.1. Die eukaryontische Zelle

Zellen als kleinste Einheiten lebender Organismen lassen sich in die Klassen der Eukaryonten und Prokaryonten einteilen. Eukaryonten unterscheiden sich hierbei von den Prokaryonten durch das Vorhandensein eines Zellkerns und einer komplexen Kompartimentalisierung weiterer Zellbestandteile. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem mit eukaryontischen Kulturzellen gearbeitet. Im Nachfolgenden werden die relevantesten Zellbestandteile kurz vorgestellt. Für eine ausführlichere Darstellung siehe z.B. [9].



**Abb. 2.1: Skizze einer eukaryontischen Zelle**

Dargestellt ist ein Schnitt durch eine Tierzelle mit den wichtigsten Zellkompartimenten. Die gesamte Zelle mit einer Abmessung in der Größenordnung von 10 – 100µm ist von einer Plasmamembran umgeben. Innerhalb der Zelle befinden sich unter anderem der Zellkern (lila), das raue und glatte endoplasmatische Retikulum (blau und violett), die Mitochondrien (orange) und der Golgi-Apparat (rot). Neben diesen Zellorganellen besteht die Zelle zum großen Teil aus dem Zytoplasma (türkis), einer Lösung aus unterschiedlichen Proteinen und Stoffen, die im wässrigen Zytosol gelöst sind. Nicht dargestellt ist unter anderem das Zytoskelett, welches aus einem dynamischen Filamentnetzwerk besteht, das sich durch die gesamte Zelle spannt. *Abbildung nach [10]*

Abb. 2.1 zeigt die Skizze einer eukaryontischen Zelle. Die wichtigsten Zell-Bestandteile und deren prominenteste Aufgaben sind wie folgt:

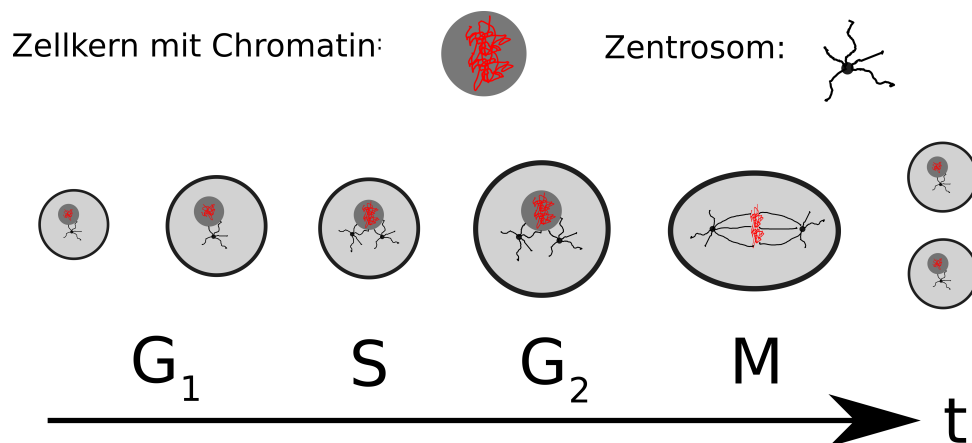
- **Plasmamembran:**  
(5-10)nm dünne Lipiddoppelschicht zur Abgrenzung der Zelle nach außen und zum Stoffaustausch mit der Umgebung

- **Zytoplasma:**  
Grundsubstanz der Zelle, bestehend aus einem Gemisch aus unterschiedlichen Proteinen und weiteren Bestandteilen im wässrigen Zytosol
- **Zellkern:**  
Aufbewahrungsort des Erbguts sowie zuständig für DNA-Replikation, Transkription und Proteinaustausch mit dem Zytoplasma über Kernporen
- **Zytoskelett:**  
Dynamisches Netzwerk aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zur Zellstabilisierung, -bewegung und zum aktiven Transport über Motorproteine
- **Raues und glattes endoplasmatisches Retikulum:**  
Weit verzweigtes Kanalsystem aus membranumschlossenen Hohlräumen zur Protein- und Lipidsynthese
- **Golgi-Apparat:**  
Stapel aus membranumschlossenen Hohlräumen zur Membranmodifizierung und -synthese sowie zum Vesikeltransport
- **Mitochondrien:**  
Doppelmembranumschlossene Zellorganelle mit eigenem Erbgut zur Energieproduktion (ATP-Synthese) - kann bisweilen lose dynamische Netzwerke in der Zelle ausbilden

### Zellzyklus und Zellteilung

Zellen durchlaufen zudem einen Zellzyklus, der grob aus vier Schritten besteht (siehe Abb. 2.2):

- **Erste Wachstumsphase  $G_1$ :** die Zelle wächst, Proteine werden synthetisiert und die Anzahl an Zellorganellen steigt
- **Synthesephase S:** das Zentrosom und die im Zellkern vorhandenen Chromosomen werden verdoppelt



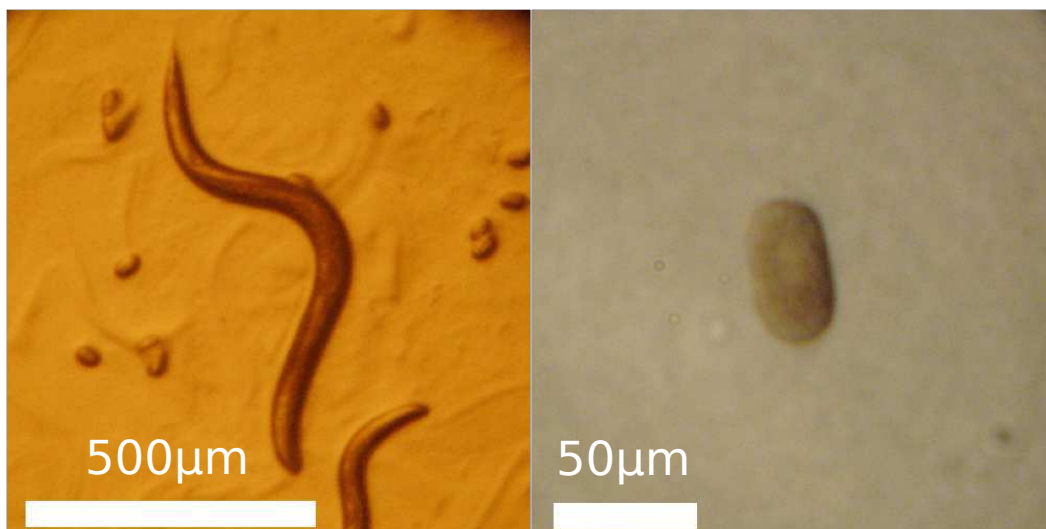
**Abb. 2.2: Skizze des Zellzyklus**

Innerhalb der ersten Wachstumsphase ( $G_1$ ) wächst die Zelle. Zentrosomen und das im Zellkern vorhandene Chromatin verdoppeln sich in der Synthesephase (S) und die Zelle wächst weiter ( $G_2$ ). In der Mitose (M) kondensiert das Chromatin, der Zellkern zerfällt und die Chromosomen werden von der Spindel zwischen den Zentrosomen separiert. Hierbei entstehen zwei Tochterzellen.  $G_1$ , S und  $G_2$  werden auch als Interphase bezeichnet.

- **Zweite Wachstumsphase  $G_2$ :** die Zelle wächst und Proteine werden synthetisiert
- **Mitose M:** innerhalb der Pro-, Meta-, Ana- und Telophase bildet sich die Spindel zwischen den Zentrosomen aus und das Chromatin kondensiert im Zellkern; nachdem der Zellkern zerfällt werden die Chromosomen vom Spindelapparat separiert; nach der Einschnürung der Plasmamembran (Zytokinese) und der Entstehung neuer Zellkerne liegen nun zwei Tochterzellen vor.

## 2.2. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [11, 12], kurz *C. elegans*, aus der Gruppe der Rhabditiden ist eines der wichtigsten Modellsysteme der modernen Entwicklungsbiologie und Genetik und seit fast 50 Jahren immer wieder im Fokus dieser Wissenschaften. Wurmembryonen entwickeln sich in einem ellipsoiden Ei aus Chitin mit einer Größenabmessung von ca. 30µm bzw. 50µm in kurzer und langer Halbachse, während der adulte Wurm eine Größe von ca. 1mm Länge und 65µm Durchmesser besitzt (siehe Abb. 2.3). Da sowohl der adulte Wurm als auch der Embryo in der Eihülle transparent sind, lassen sich beide Zustände ohne größere Umstände mittels lichtmikroskopischer Methoden untersuchen. Der Großteil der Würmer besteht aus Hermaphroditen, wodurch die Fortpflanzung meist durch Selbstbefruchtung geschieht. Der Wurm bildet hierbei zuerst die Spermien und dann die Oozyten, die in der Spermathek des Wurms befruchtet werden. Ungefähr 0,2% der Würmer liegen als Männchen vor, wodurch zu einem geringen Teil auch sexuelle Fortpflanzung über Kopulation zwischen Hermaphrodit und Männchen stattfinden kann. Eine der für wissenschaftliche Untersuchungen auszeichnendsten Charakteristiken des Wurms ist die der **Eutolie** (Zellkonstanz). So besitzt jeder adulte Wurm dieselbe Anzahl an somatischen Zellkernen (Hermaphroditen exakt 959, Männchen 1031). In seiner Entwicklung verfolgt der Embryo eine invariante Abfolge von Zellteilungen in un-

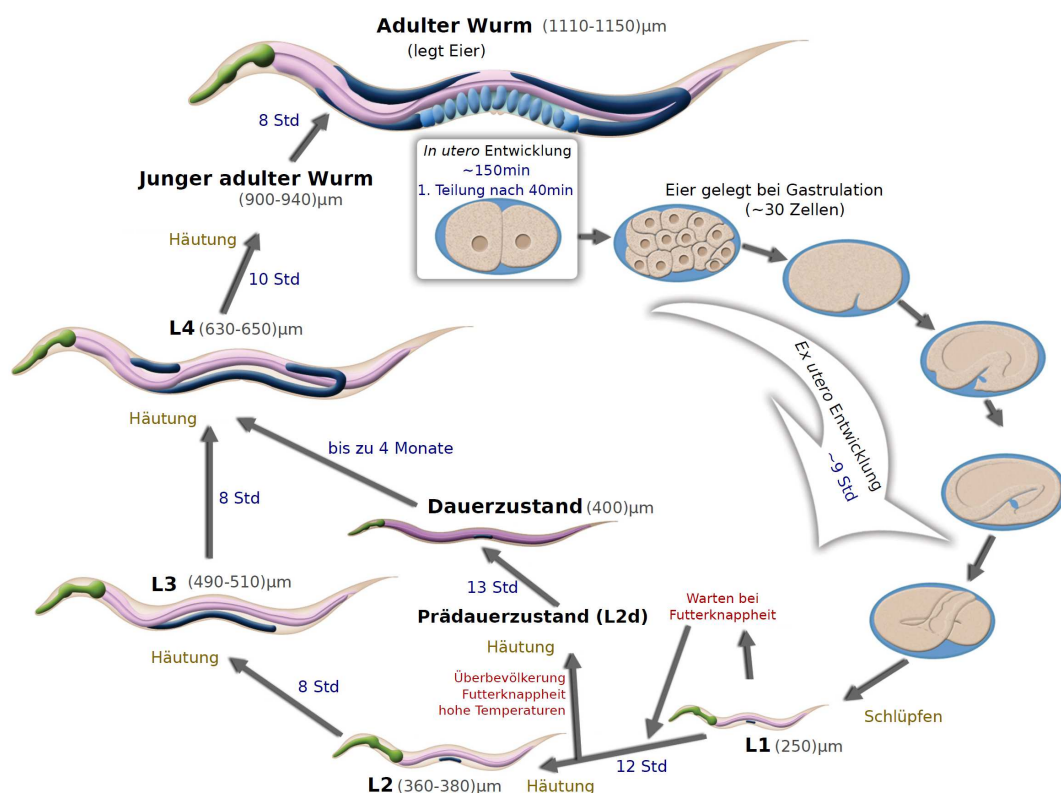


**Abb. 2.3: Durchlichtaufnahmen eines adulten Wurms und eines befruchteten Embryos**  
Das linke Bild zeigt einen adulten Wurm auf einer Platte zur Wurmku-  
ltivierung. Der Wurm ist umgeben von mehreren abgelegten Eiern in frühen Entwicklungsstadien. Das rechte Bild zeigt den Embryo in einem Puffertropfen zum Zeitpunkt des *Nuclear Meetings* der beiden Pronuklei kurz vor der Entstehung des ersten Zellkerns. Die Pronuklei sind als leicht hellere Punkte in der Mitte des Eis zu erkennen. Beide Aufnahmen wurden über ein Durchlichtmikroskop (Leica S8 APO) getätigt.

terschiedliche Zelllinien [13–15], die, in den frühen Stadien der Entwicklung, von einer sehr hohen Wiederholgenauigkeit bezüglich der Teilungszeitpunkte, Zelltrajektorien und Zellgrößen begleitet sind [16, 17]. Das Genom des Wurms wurde 1998 vollständig sequenziert [18]. Eine umfangreiche Auswahl an stabil transfizierten Wurmlinien mit unterschiedlichen Mutationen und Fluorophorfärbungen verschiedener Organellen ist über das **CGC** (*Caenorhabditis Genetics Center*) der *University of Minnesota* (USA) erhältlich. Ebenso lassen sich unterschiedliche Arten der RNA-Interferenz auf den Wurm anwenden [19, 20], was zum partiellen **Gen-Knockdown** (Stilllegung von Genen) verwendet werden kann, um z.B. die Rolle bestimmter Proteine in der Entwicklung des Wurmes zu erforschen.

### 2.2.1. Lebenszyklus des *C. elegans*

Die komplette Embryogenese des *C. elegans* dauert bei einer Umgebungstemperatur von 20°C ungefähr 16 Stunden vom befruchteten Ei zum ersten Larvenstadium [21]. Direkt nach der Befruchtung bildet sich die Chitin-Eihülle, die den Embryo vor Umwelteinflüssen schützt. Ungefähr beim Erreichen des 24-Zell Zustandes und somit kurz vor dem Einsetzen der Gastrulation legt der Wurm das Ei ab.



**Abb. 2.4: Lebenszyklus des *C. elegans***

Die Abbildung zeigt den Entwicklungskreislauf eines Wurms von der Befruchtung und der Eiablage an hin zum adulten Stadium. Die befruchteten Eier (als hellblaue Ellipsoide dargestellt) befinden sich zunächst im Eileiter des adulten Wurmes und werden typischerweise zu einem Zeitpunkt kurz vor der Gastrulation abgelegt. Der geschlüpfte Wurm durchläuft nun vier Larvenstadien, kann unter externem Stress aber auch über einen Dauerzustand zwei Larvenstadien umgehen. Die vermerkten Zeitdauern der Entwicklungsschritte gelten bei ca. 22°C Umgebungstemperatur. *Abbildung nach [22, 23]*

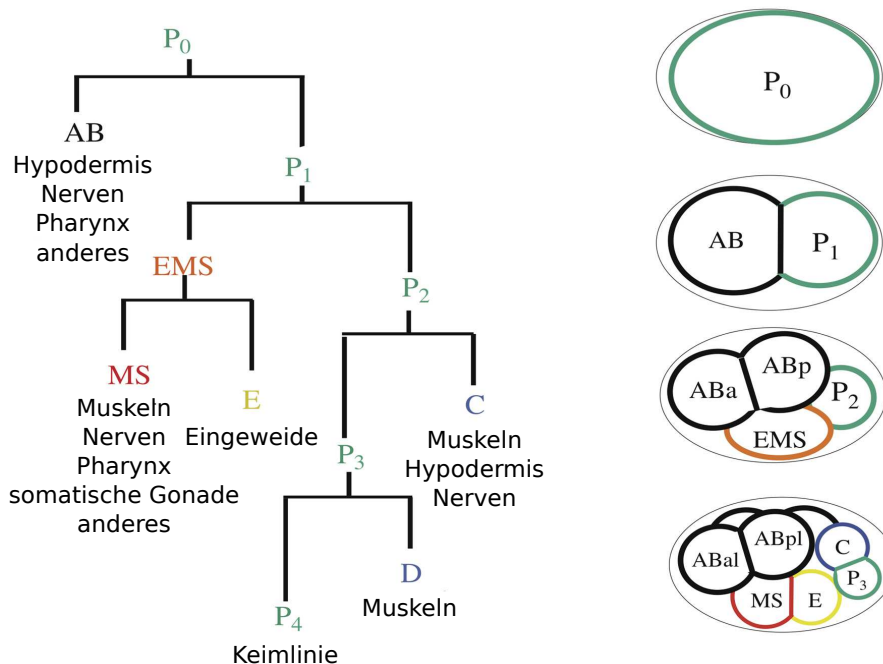
Der Embryo erreicht beim Schlüpfen eine Zellkernanzahl von 558 (für den Hermaphroditen) [21]. Danach durchläuft das Tier vier Larvenstadien und kommt nach ungefähr 3 Tagen ab dem Zeitpunkt der Befruchtung im adulten Stadium an und beginnt selbst damit, Nachwuchs zu produzieren (siehe Abb. 2.4). Nach 2-3 Tagen ist der Eigenvorrat an Spermien beim Hermaphroditen aufgebraucht. Die Paarung mit einem Männchen ermöglicht hierbei das Erzeugen weiterer Nachkommen. Das Tier kann mehrere Wochen von hier an weiterleben.

Bei Futterknappheit kann der Wurm im L2-Larvenstadium zudem auch in einen sogenannten Dauerzustand übergehen [24], der ihm das Überleben über mehrere Monate ohne Futter und unter widrigen Umweltbedingungen ermöglicht. Bei verbesserten Bedingungen kann der Wurm so später seine Entwicklung wiederaufnehmen.

### 2.2.2. Frühe Embryogenese und Symmetriebrüche

#### Asymmetrische Zellteilungen, Körperachsen und Gründerzellen

Während der frühen Embryogenese kommt es zu fünf asymmetrischen Zellteilungen, die sechs Gründer-Zellen *AB*, *MS*, *E*, *C*, *D* und *P<sub>4</sub>* hervorbringen [25]. In der ersten Zellteilung spaltet sich die Zygote *P<sub>0</sub>* in *AB* auf der anterioren Seite und *P<sub>1</sub>* auf der posterioren Seite auf. *P<sub>1</sub>* teilt sich nun in *EMS* und *P<sub>2</sub>*, *EMS* in *MS* und *E*, *P<sub>2</sub>* in *C* und *P<sub>3</sub>* und schließlich *P<sub>3</sub>* in *D* und *P<sub>4</sub>* [13, 25] (siehe Abb. 2.5).



**Abb. 2.5: Ausbildung der Gründerzellen im frühen Embryo**

Aus der Zygote erfolgt eine Aufspaltung in die 6 Gründerzellen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen ihrer Tochterzellen. In der Abbildung rechts sind die groben Zellanordnungen innerhalb der Eihülle für den (1-8)-Zellzustand skizziert. Diese sind für alle Embryonen mit hoher Übereinstimmung vergleichbar. *Abbildung nach [14]*

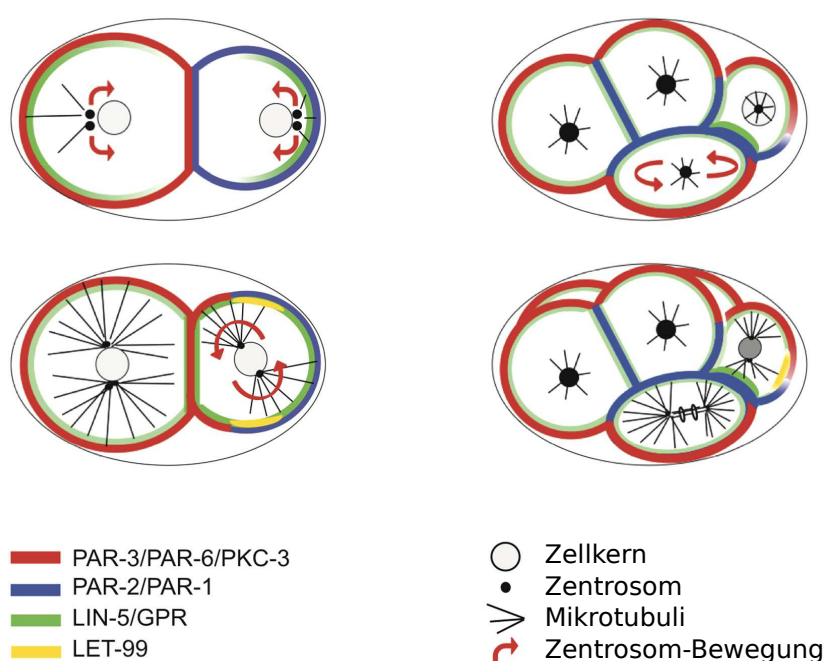
Neben der Aufteilung in die Gründerzellen findet in den ersten drei Zellteilerunden aufgrund von Symmetriebrüchen auch die Festlegung der drei Körperachsen des späteren Wurmes statt. Der Eintreffpunkt des Spermiums legt bereits die zukünftige posteriore Seite fest, indem er die Ausbildung von Gradienten der Proteine PAR-2 und PAR-3 steuert und somit die

Richtung der AP-Achse (Anterior-Posterior) vorgibt [26, 27]. PAR steht hier für *partitioning defective protein*. In der zweiten Zellteilung rotiert die Achse der sich teilenden  $P_1$ -Zelle in Abhängigkeit der Verteilung der PAR-Proteine aus der AP-Achse heraus [25, 28]. Die hieraus entstehende *EMS*-Zelle definiert die ventrale (bauchseitige) Ausrichtung der dorso-ventralen Körperachse (siehe Abb. 2.6). Beim Übergang vom 4- zum 6-Zeller wird schließlich die finale LR (links-rechts) Körperachse über eine Spindeldrehung der Zellen *ABa* und *ABp* festgelegt, welche in einem leichten posterioren Versatz des Zellpaares *ABar* und *ABpr* zum Zellpaar *ABal* und *ABpl* resultiert. Die Spindeldrehung hat ihren Ursprung in einem Vorgang namens **chiraler Morphogenese** [13, 29, 30].

### Entstehung von Proteingradienten

Zur Differenzierung der einzelnen Zellen ist bisweilen eine Umverteilung relevanter Signalmoleküle, sogenannter **Morphogene**, nötig. Durch eine Musterbildung in den frühen Zellen des Embryos können so Proteingradienten entstehen, die bezüglich des Schicksals der Tochterzellen bei der Zellteilung entscheidend sein können. Bereits 1952 wurde gezeigt, dass die Entstehung sogenannter **Turing-Muster** aus einer homogenen Verteilung von Proteinen im Rahmen eines **Reaktions-Diffusions-Modells** beschrieben werden kann [6]. Hierbei findet eine räumliche Musterbildung mehrerer Morphogene mit unterschiedlichem Diffusionsverhalten über Prozesse der Katalysierung oder Produktionsinhibierung statt. Die Entstehung von Morphogengradienten und die zugrundeliegenden Prozesse sind hierbei nach wie vor im Fokus aktueller Forschung [31].

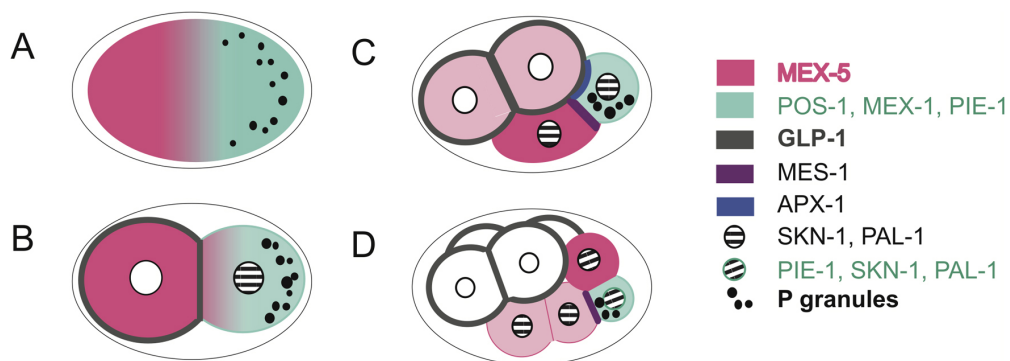
Auch in *C. elegans* findet beispielsweise noch vor der ersten asymmetrischen Zellteilung in  $P_0$  aufgrund der Symmetriebrechung des Spermiums die Ausbildung einer polarisierten Verteilung der PAR-Proteine statt. Sowohl die vom Spermium stammenden Zentrosomen, als auch ein



**Abb. 2.6: Spindeldrehungen und Zellausrichtungen im frühen Embryo**

Gezeigt sind die Ausrichtung der Spindelorientierungen beim Übergang vom 2- zum 4-Zellzustand und vom 4- zum 8-Zellzustand, sowie farblich kodiert die involvierten Proteinverteilungen. Abbildung nach [14]

Protein namens CYK-4 sind hier relevant. CYK-4 inaktiviert Rho, was die actomyosinbasierte Kontraktilität auf posteriorer Seite stört und zu einer Kontraktion in Richtung der anterioren Seite führt. Mikrotubuli, die an den Zentrosomen kondensieren, können die Bewegungen des Aktinkortex unterstützen. PAR-3 und PAR-6 Proteine können so zur anterioren Seite gelangen und sich am Cortex anlagern, während PAR-2 sich darauffolgend am posterioren Cortex anlagert (siehe [32] für einen *Review*-Artikel über PAR-Proteine). Der PAR-2 / PAR-6 Gradient erzeugt kortikale Strömungen in der  $P_0$ -Zelle, die für eine zytoplasmische Umverteilung weiterer Proteine notwendig sind. Nach der Ausbildung der PAR-Protein-Verteilung entstehen weitere Asymmetrien in der zytoplasmischen Verteilung von bestimmten Proteinen, die ihrerseits wieder zur zytoplasmischen Umverteilung beitragen können. Diese sogenannten **polarity mediators** steuern die Verteilung von **cell fate regulators**, also Proteinen, die das weitere Schicksal der entstehenden Tochterzellen bei einer Teilung bestimmen. Neben direktem Transport sind auch lokale Degradation und Proteintranslation für diese ungleiche Verteilung von **cell fate regulators** relevant [25]. Ein Beispiel für die **polarity mediators** ist das Protein MEX-5. Am Ende des einzelligen Zustandes befindet sich dieses größtenteils im anterioren Bereich des Zytoplasmas. Die Umverteilung von MEX-5 ist begleitet von einer erhöhten Mobilität des Proteins im posterioren Bereich des Embryos. Zugrunde hierfür liegt wahrscheinlich ein Gradient in der PAR-1 Verteilung, der zur Phosphorylierung von MEX-5 im anterioren Ende führt und zusammen mit einer Dephosphorylierung im posterioren Ende durch PP2A die MEX-5-Proteinverteilung im Einzeller zur Folge hat [14, 33, 34]. MEX-5 steuert nun unter anderem die Verteilung des **cell fate regulators** PIE-1, der sich zunächst in Richtung der entstehenden Vorgänger-Zelle  $P_1$  der späteren Keimbahn umverteilt und in den Zellen der somatischen Zelllinie nach der Zellteilung in Abhängigkeit von MEX-5 abgebaut wird [35]. Die Art und Weise der Umverteilung von PIE-1 insbesondere innerhalb der  $P_0$ -Zelle bleibt Gegenstand aktueller Forschung und wird auch in dieser Arbeit behandelt. In der jüngeren Vergangenheit wurde ein Reaktions-/Diffusions-Modell vorgeschlagen, innerhalb dessen sich die Proteinverteilung von PIE-1, ähnlich wie bei MEX-5, unter einer begleitenden, ortsabhängigen Mobilitätsveränderung in das nun posteriore Ende des Embryos verschiebt [36]. So entstehen bereits vor der ersten Zellteilung räumliche Verteilungen von Proteinen, wie in Abb. 2.7 skizziert.



**Abb. 2.7: Asymmetrische Verteilung von Proteinen im frühen Embryo**

Gezeigt sind die entstehenden Proteingradienten bzw. -verteilungen im (1-8)-Zellzustand des Embryos. Im Einzeller (A) ist der zunächst entstehende Gradient von MEX-5 (rot) mit einer hohen Konzentration auf der anterioren Seite des Embryos zu erkennen. Dieser führt zur Ausbildung des PIE-1-Gradienten (grün) und einer Verteilung hin zur posterioren Seite zusammen mit *P granules*, welche aus Agglomeraten von mehreren Proteinen und RNA bestehen. PIE-1 und *P granules* bleiben in den anschließenden Zellteilungen (B-D) in den Vorgängern der Keimbahn. *Abbildung nach [14]*



Für einen Überblick über weitere relevante und beteiligte Proteine in dieser Gradientenausbildung siehe z.B. [14]. Dies ist nur ein Beispiel von vielen in der frühen Embryogenese von *C. elegans*, bei der die kortikale und zytoplasmische Proteinumverteilung und Gradientenentstehung zu Symmetriebrechung und Diskriminierung von Zellen führt. Neben diesen biochemischen Einflüssen führen zumindest bis zur Gastrulation insbesondere auch rein mechanische Kräfte zwischen den asymmetrisch geteilten Zellen und der einhüllenden Eihülle zu determinierten Zellanordnungen und Zelltrajektorien [16, 17], was auch einen weiteren Untersuchungsbestandteil der vorliegenden Arbeit darstellt.

## 2.3. Diffusion in lebenden Zellen

### 2.3.1. Diffusion in Zellen als Transportmechanismus

Diffusion, also die ungerichtete, zufällige Bewegung von Teilchen aufgrund ihrer thermischen Energie, dient in Zellen als passiver Transportvorgang, für den keine zusätzliche Energie aufgebracht werden muss. Dem hingegen wird bei zielgerichteten Transportvorgängen, wie etwa dem Transport entlang des Zytoskeletts durch Motorproteine, Energie verbraucht. Diffusion in der Zelle kann z.B. zur Durchmischung von Proteinen im Zytoplasma oder auf einer Membran führen. Reaktionen in der Zelle bzw. an bestimmten Zellorganellen können so auch durch die Diffusion zeitlich limitiert werden. Durch die Abhängigkeit von z.B. der Viskosität des umgebenden Mediums, vorhandenen Netzwerkstrukturen und der Menge und Größe anderer Makromoleküle in den unterschiedlichen Umgebungen der Zelle können zudem unterschiedliche Arten von Diffusion erreicht bzw. beobachtet werden. Räumliche Gradienten in der Diffusivität bestimmter Proteinen innerhalb einer Zelle können des Weiteren unterschiedliche Prozesse wie die zielgerichtete Umverteilung von Proteinen beeinflussen und so die Entstehung von Konzentrationsgradienten begünstigen [36]. Die Proteindiffusion im Zytoplasma einer Zelle findet abhängig von der Größe des betrachteten Proteins typischerweise in einer Größenordnung von  $1 - 40 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  statt [37, 38], während sich die zweidimensionale Diffusion von Molekülen auf Membranen in der Region von  $0,01 - 1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  abspielt [37, 39].

### 2.3.2. Diffusion als Brownsche Bewegung

Unter **Brownscher Bewegung** [40–44] versteht man die ungerichtete Bewegung von mikroskopisch sichtbaren Teilchen in viskosen Medien, wie Gasen und Flüssigkeiten. Diese wird durch die räumlich ungeordnete Wärmebewegung von Molekülen und die darauffolgenden Stöße zwischen den Teilchen hervorgerufen. Diese Art der Bewegung wird auch **random walk** genannt. Die Bewegungsgleichung eines solchen Teilchens mit einer Masse  $m$  ist nach Langevin für einen überdämpften Fall gegeben als:

$$F_{\text{ext}} - \gamma \frac{dx}{dt} + F'(t) = 0 \quad (2.1)$$

mit einer externen Kraft  $F_{\text{ext}}$ , dem **Stokeschen Reibungskoeffizienten**  $\gamma$  und einem zeitlich unkorrelierten fluktuierenden Beitrag  $F'(t)$  der thermischen Bewegung. Überdämpft bedeutet hierbei, dass der Beitrag der Reibung mit  $\gamma \frac{dx}{dt}$  wesentlich größer ist als die Trägheit der Masse mit  $m \frac{d^2x}{dt^2}$ .

Da aufgrund der stochastischen Natur der ungerichteten Bewegung das Zeitmittel über die Verschiebungen der Teilchen verschwindet, wird zur Quantifizierung der Partikelbewegung die mittlere quadratische Verschiebung (**MSD: mean square displacement**) betrachtet. Hierfür wird

der zeitliche Mittelwert des MSD  $\langle MSD(\tau) \rangle_t$  einer Partikeltrajektorie  $x(t)$  in Abhängigkeit zum Zeitabstand  $\tau$  über eine Zeitspanne aus  $N$  vorkommenden Zeitpunkten  $t_i$  gebildet

$$\langle MSD(\tau) \rangle_t = \langle (x(t_i + \tau) - x(t_i))^2 \rangle_t = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x(t_i + \tau) - x(t_i))^2 \quad (2.2)$$

Liegt **Ergodizität** vor [45], verhalten sich Zeit- und Ensemble-Mittel des Systems also gleich, kann auch das Ensemble-Mittel  $\langle MSD(\tau) \rangle_E$  über die einzelnen Trajektorien  $x_i(t)$  aller  $M$  Teilchen verwendet werden:

$$\langle MSD(\tau) \rangle_E = \langle (x_i(\tau) - x_i(0))^2 \rangle_E = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (x_i(\tau) - x_i(0))^2 \quad (2.3)$$

Bei Abwesenheit externer Kräfte  $F_{\text{ext}}$  und unter Verwendung des **Äquipartitionstheorems** [46] mit der **Boltzmann-Konstante**  $k_B$  und der Umgebungstemperatur  $T$  gilt nun:

$$\langle MSD(\tau) \rangle_t = \frac{2 \cdot k_B T \cdot \tau}{\gamma} \quad (2.4)$$

Nach dem **Fluktuations-Dissipations-Theorem** ergibt sich nun aus der **Einstein-Smoluchowski-Beziehung** eine Abhängigkeit des MSD in einem  $n$ -dimensionalen System zum **Diffusionskoeffizienten**  $D$  gemäß [47]

$$\langle MSD(\tau) \rangle_t = 2 \cdot n \cdot D \cdot \tau \quad (2.5)$$

Im Falle sphärischer Teilchen mit dem hydrodynamischen Radius  $R_0$  und für kleine **Reynoldszahlen**  $Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\eta} \ll 1$  (hierbei steht  $\rho$  für die Dichte des Mediums,  $v$  für die Geschwindigkeit des Körpers,  $d$  für die charakteristische Länge des Körpers und  $\eta$  für die dynamische Viskosität des Mediums), erhält man durch Einsetzen des nun gültigen Stokesschen Reibungskoeffizient  $\gamma = 6\pi\eta R_0$  die sogenannte **Stokes-Einstein-Gleichung** [48]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0} \quad (2.6)$$

### Normale vs anomale Diffusion

In komplexeren Medien kann anstelle der normalen Diffusion, wie oben beschrieben, auch die sogenannte **anomale Diffusion** auftreten [49–51]. Hierbei steigt das MSD nicht mehr linear bzgl. der betrachteten Zeitabstände  $\tau$  sondern folgt einem Potenzgesetz gemäß

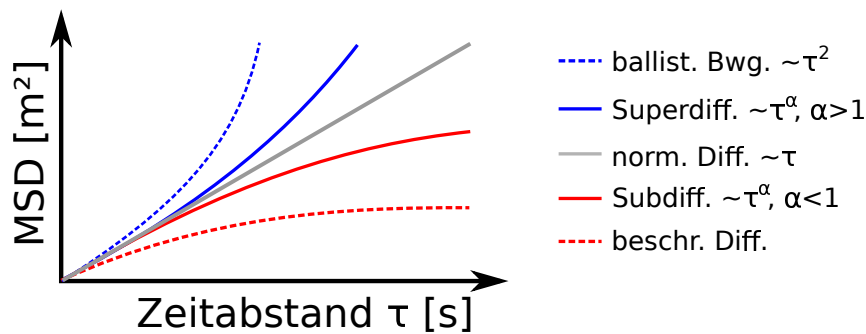
$$\langle MSD(\tau) \rangle_t = 2 \cdot n \cdot \Gamma_\alpha \cdot \tau^\alpha \quad (2.7)$$

mit der anomalen Diffusionskonstante  $\Gamma_\alpha$  und dem Anomalieparameter  $\alpha$ . Man unterscheidet zwischen unterschiedlichen Arten der anomalen Diffusion (siehe Abb. 2.8):

- **Subdiffusion:**  $0 < \alpha < 1$
- **Superdiffusion:**  $\alpha > 1$
- **Ballistische Bewegung:**  $\alpha = 2$

Der Spezialfall  $\alpha = 1$  steht hier für normale Diffusion. Subdiffusives Verhalten kann unterschiedliche Gründe haben. Gerade im Inneren von Zellen kann ein Effekt namens **macromolecular crowding** aufgrund der hohen Dichte an Makromolekülen und Zellorganellen im Zytoplasma

die Bewegung der verfolgten Teilchen auf längeren Zeitskalen hemmen [52]. Diese *Crowder* bewegen sich sehr viel langsamer oder gar nicht im Bezug auf die untersuchten Teilchen und können die Bewegung auch in einem Untervolumen einsperren, was zur **beschränkten Diffusion** bei langen betrachteten Zeitabständen führt. Ebenso zeichnet sich z.B. Diffusion auf Zellmembranen durch einen anomalen Charakter aus [53]. Weitere Beispiele subdiffusiven Verhaltens sind Diffusion auf fraktalen Strukturen oder in Polymernetzwerken [54]. Superdiffusion wird z.B. bei sogenannten **Lévy-Flight** Prozessen beobachtet [55]. Auch Mischungen aus aktiver Bewegung unterbrochen von rein diffusivem Verhalten können ein superdiffusives Verhalten des MSD zeigen. Ein aktiver Transport, z.B. von Molekülen durch Motorproteine in der Zelle, ist hierbei durch ein ballistisches Verhalten des MSD gekennzeichnet.



**Abb. 2.8: Darstellung der mittleren quadratischen Verschiebung für unterschiedliche Diffusionsarten**

Zu sehen sind schematische Darstellungen des MSD gegen den Zeitabstand  $\tau$  für die im Fließtext beschriebenen Arten an Diffusion. Neben der normalen Diffusion kann auch Subdiffusion auftreten, was zu einem vergleichsweise erhöhten (superdiffusiven) oder erniedrigten (subdiffusiven) Anwachsen des MSD bei höheren Zeitabständen führt.

Je nach der zugrundeliegenden Ursache und den betrachteten Längenskalen kann in einem realen, begrenzten System, wie dem einer Zelle, anomale Diffusion auch nur innerhalb bestimmter Zeitskalen beobachtet werden und z.B. für sehr kleine oder sehr große Zeitabstände normale Diffusion gemessen werden [56, 57]. Zudem kann für bestimmte Arten anomaler Diffusion eine Verletzung der Ergodizität vorliegen ( $\langle MSD(\tau) \rangle / \langle MSD(\tau) \rangle_E \neq 1$ ). Dies kann z.B. für solche Prozesse gelten, die mit einem **continuous time random walk** beschrieben werden können [54], also mit einem stochastischen Sprungprozess mit zwei unabhängigen Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Schrittweite und die Zeitabstände zwischen den Sprüngen.

### Messung von Diffusion

Die Quantifizierung des Proteintransports, insbesondere der Proteindiffusion im Inneren von lebenden Zellen und Organismen, kann wertvolle Einblicke in die dort stattfindenden Prozesse geben. So sind zum Beispiel biochemischen Reaktionen in der Zelle bisweilen diffusionslimitiert und werden so über die Zeitskalen der Transportprozesse in der Zellumgebung beeinflusst. Zudem können räumlich ausgedehnte Diffusionsmessungen auf unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen Aufschluss über Viskositäten, Strukturen und räumliche wie zeitliche Heterogenitäten in der Umgebung von biologischen Proben geben und zudem Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Proteinen miteinander sichtbar machen.

Zur Quantifizierung von Diffusion wurden über die Jahre eine Auswahl an unterschiedlichen Messmethoden entwickelt, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden:

Einer der direktesten Messansätze ist die Berechnung des MSD aus den rekonstruierten Trajektorien einer Einzelpartikelverfolgung (siehe Unterkap. 3.2.2). Für ausreichend lange Messungen oder durch die Bildung eines Ensemblemittels kann so das zeitliche MSD entsprechend bestimmt und ausgewertet werden.

Eine Messung des zeitlich gemittelten MSDs kann zudem in einer Fluoreszenzkorrelationsmessung (siehe Unterkap. 3.2.1) durchgeführt werden. Hier wird die typische Zeitskala der Verweildauer beweglicher fluoreszenzmarkierter Partikel in einem Observationsvolumen bekannter Abmessungen anhand einer Autokorrelation der zeitlichen Konzentrationsschwankungen bestimmt.

Zudem ist es möglich, über Bleichexperimente (siehe Unterkap. 3.2.4) das Gleichgewicht an ungebleichten Partikeln in der Probe lokal zu stören. Im Anschluss daran können durch die Betrachtung der zeitlichen Equilibrierung des Systems Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Diffusions- oder Bindungsprozesse gezogen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten beweglicher Partikel ist die Durchführung von Streuexperimenten. Hierbei wird erneut die Zeitskala des Korrelationsabfalls zeitlicher Fluktuationen in der Probe betrachtet. Dieser ist in einem Streuexperiment abhängig vom untersuchten Streuwinkel und dem Diffusionskoeffizienten der gemessenen Partikel. In dieser Arbeit wird eine Realisierung dieser Messmethode in Form einer Kleinstwinkelstreuung anhand von Bildaufnahmen verwendet (siehe Unterkap. 3.2.3).

Neben weiteren Bild- bzw. fluoreszenzbasierten Methoden gibt es zudem noch Möglichkeiten z.B. über eine Spinmarkierung von Molekülen deren Diffusionsverhalten in einer Kern- oder Elektronenspinresonanzspektroskopiemessung zu bestimmen [58–60]. Diese Techniken werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter behandelt.

### 3. Methoden

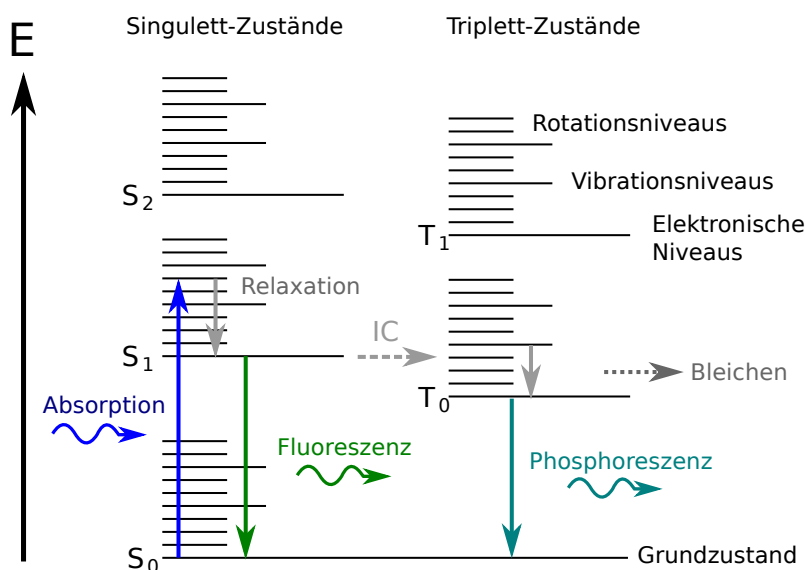
*Dieses Kapitel soll einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und den dazu nötigen theoretischen Hintergrund geben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Techniken basieren entweder auf Fluoreszenzmikroskopie oder wurden an einem Fluoreszenzmikroskop implementiert. Die ersten Abschnitte beschäftigen sich daher mit dem Prinzip und den Hintergründen der klassischen Fluoreszenzmikroskopie, sowie einer verwendeten Bildrekonstruktionsmethode zur höchstauflösenden Mikroskopie. Der zweite Teil dieses Kapitels hat unterschiedliche Techniken zur quantitativen Untersuchung diffusiven Verhaltens zum Inhalt, während der letzte Abschnitt eine kurze Einführung in den Hintergrund von Ablationsexperimenten behandelt. Für tiefere theoretische Ausführungen wird an den entsprechenden Stellen auf Quellen verwiesen. Weitere Details, insbesondere zur Implementierung der einzelnen Methoden in den Versuchsaufbauten, finden sich in den entsprechenden Kapiteln der Abschnitte II und III.*

#### 3.1. Fluoreszenzmikroskopie

Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Techniken ist die sogenannte Fluoreszenzmikroskopie [61], die eine Unterkategorie der Lichtmikroskopie darstellt. Hierbei wird zunächst die zu untersuchende Probe mittels fluoreszenter Farbstoffmoleküle, sogenannter **Fluorophore**, markiert. Diese können durch Photonen bestimmter Wellenlänge angeregt werden und emittieren daraufhin selbst räumlich isotrop langwelligeres („**Stokesverschobenes**“) Licht. Die emittierten Photonen werden über ein Objektiv detektiert und auf einen Kamerasensor abgebildet um die örtliche Fluorophorverteilung anhand der räumlichen Verteilung der Detektionsintensität zu quantifizieren. Art und Weise der Anregung und Detektion sind hierbei von der verwendeten Mikroskopietechnik abhängig.

##### 3.1.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz wird beschrieben als die durch die Absorption von Photonen induzierte Emission von Licht durch Fluorophore. Der auf internen Relaxationsprozessen basierende Wellenlängenunterschied zwischen Absorption und langwelligerer Emission ist der sogenannte **Stokes-Shift**. Einstrahlende Photonen werden von Fluorophoren absorbiert, indem deren Hüllenelektronen durch die aufgenommenen Energie vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in einen höheren angeregten elektronischen Zustand angehoben werden. Dies geschieht auf einer Zeitskala von ca.  $10^{-15}$  s. Photonen mit einer Wellenlänge  $\lambda_0$  im Vakuum besitzen hierbei eine Photonenenergie  $E = h \frac{c_0}{\lambda_0}$  mit dem **Planckschen Wirkungsquantum**  $h$  und der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum  $c_0$ . Vom angeregten Zustand relaxiert das System zunächst strahlungslos über Wechselwirkungen mit der Umgebung in niedrigere Rotations- bzw. Schwingungsniveaus (Zeitskala  $10^{-12}$  s). Durch die Emission von Photonen einer nun größeren Wellenlänge kann das Molekül wieder in den Grundzustand übergehen (Zeitskala  $10^{-9}$  s, siehe Abb. 3.1). Dieser Vorgang wird **Fluoreszenz** genannt. Das Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors unterscheiden sich demnach und sind abhängig von der Energiedifferenz der möglichen Energieniveaus im Molekül (siehe Abb. 3.2). Über **Interkombination (IC, intersystem-crossing)** kann ein angeregtes Molekül über einen quantenmechanisch verbotenen Spin-Umklapp auch von einem angeregten Energieniveau in einen angeregten Triplettzustand wechseln. Von dort kann das Molekül wiederum relaxieren und über einen Spin-Umklapp und Photonenemission den Grundzustand erreichen, was **Phosphoreszenz** genannt wird. Hierbei ist es aufgrund einer erhöhten Reaktivität des Moleküls mit seiner Umwelt und längeren Lebenszeiten (Zeitskala  $10^{-6}$  s) im Triplettzustand auch anfälliger für photochemische Reaktionen. Diese können eine Konformationsänderung und den irreversiblen oder langlebigen Verlust der Fluoreszenzeigenschaft



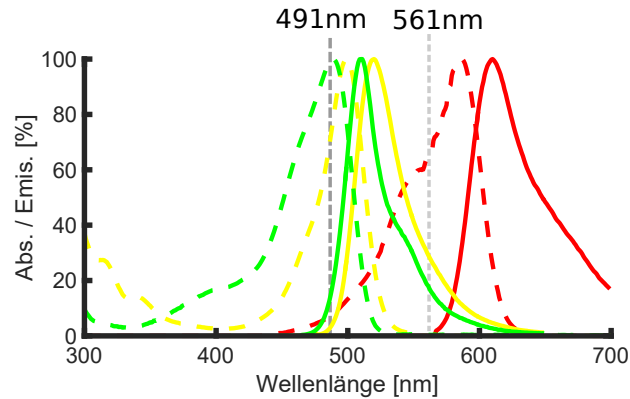
**Abb. 3.1: Jablonski-Diagramm**

Gezeigt ist ein Jablonski-Diagramm der Energieniveaus eines Fluorophors. Durch die Absorption von Photonen werden Elektronen vom Grundzustand in energetisch höhere, angeregte elektronische Zustände angehoben (Zeitskala  $10^{-15}$  s). Nach einer strahlungslosen Relaxation in niedrigere Rotations- und Vibrationsniveaus ( $10^{-12}$  s) kann über Photonenemission / Fluoreszenz ( $10^{-9}$  s) wieder der Grundzustand erreicht werden. Über *Intersystem-crossing* (IC) ist auch der Übergang in Triplettzustände möglich, von denen das Molekül durch Lichtemission über Phosphoreszenz ( $10^{-6}$  s) in den Grundzustand wechseln kann oder ein Verlust der Fluoreszenzeigenschaft durch Bleichen möglich ist.

(**Bleaching**, deutsch: Bleichen) zur Folge haben. Zudem kann dieser Vorgang in lebenden biologischen System zu unerwünschten phototoxischen Effekten führen, die für den Organismus letal sein können oder ihn in seinem Verhalten unerwünscht beeinflussen können [62].

### 3.1.2. Fluorophore und Fluoreszenzmarkierung

Ein in der Fluoreszenzmikroskopie entscheidender Faktor ist der zur Markierung verwendete Farbstoff bzw. Fluorophor. Neben einer großen Auswahl an synthetischen Fluoreszenzfarbstoffen gibt es auch verschiedene Proteine mit fluoreszenten Eigenschaften. Der Großteil hiervon wurde abgeleitet von einem aus der Tiefsee-Quale *Aequorea victoria* extrahierten Protein namens **GFP** (*green fluorescent protein*) [7]. Ausgehend von GFP wurde das Absorptions- und Emissionsspektrum des Proteins, Effizienz und Photostabilität durch Mutationen an unterschiedliche Anforderungen angepasst, was zu einer Fülle an heutzutage erhältlichen Fluorophoren führt. Ähnlich zu synthetischen Proben, wie bestimmten Molekülen, an deren Molekülstruktur ein gewünschtes fluoreszentes Molekül angehängt werden kann, ist es auch möglich eine gezielte Fluoreszenzmarkierung an Strukturen in lebenden Organismen wie Zellen oder Embryonen durchzuführen. Dieser Vorgang kann z.B. durch die Transfektion mittels eines DNA-Plasmids geschehen. Das Plasmid wird in den Organismus eingebracht und enthält den genetischen Code des Fluorophorproteins und einen *Promoter*, der wiederum die Transkription des neu eingebrachten Gens im Organismus initiiert. Wird der Code des Fluorophors an den Code eines anderen Proteins im Organismus verlinkt, können so gezielt einzelne Arten von Proteinen und somit auch bestimmte Zellstrukturen fluoreszenzmarkiert werden. Es ist zu unterscheiden zwischen einer transienten Transfektion und einer stabilen Transfektion. Bei ersterer wird die eingebrachte



**Abb. 3.2: Fluorophorspektren:**

Die Abbildung zeigt das wellenlängenabhängige Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linien) dreier Fluorophore (eGFP: grün, Alexa488: gelb, mCherry: rot), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Das Spektrum des Farbstoffs FITC ist nahezu deckungsgleich zum Farbstoff Alexa488. Zudem sind die Wellenlängen der in dieser Arbeit zur Anregung der gezeigten Fluorophore verwendeten Laserlinien bei 491nm und 561nm eingezeichnet.

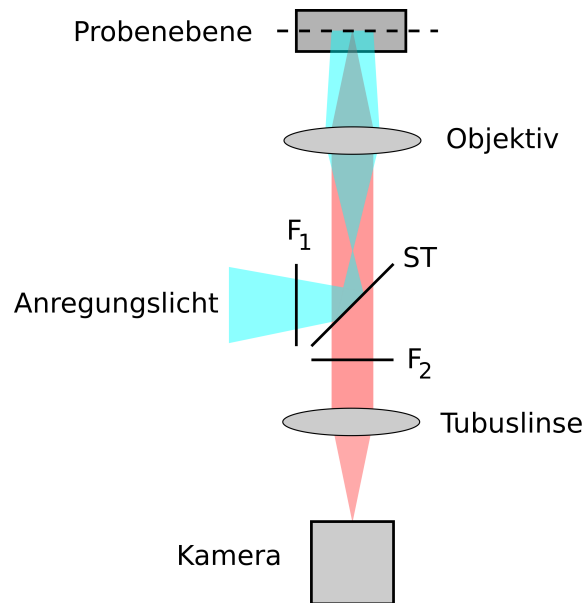
genetische Information des Fluorophors wieder aus der Zelllinie verschwinden, während stabil transfizierte Organismen die Information auch an nachfolgende Generationen weitergeben. Eine andere Methode zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung namens Immunfluoreszenz basiert auf der Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, die in die Probe eingebracht werden und an den entsprechenden Antigenen binden, um diese so zu markieren.

In dieser Arbeit wurden als Eichproben unter anderem fluoreszenzmarkierte Dextranmoleküle und mit Fluorophoren eingefärbte Polystyrolkugeln verwendet. Messungen an lebenden Organismen wurden an transient transfizierten Kulturzellen und stabil transfizierten Wurmlinien von *C. elegans* durchgeführt. Die verwendeten Fluorophore waren hierbei der synthetische Farbstoff Alexa488 und FITC sowie die Fluorophor-Proteine eGFP und mCherry (siehe Abb. 3.2).

### 3.1.3. Epifluoreszenzmikroskopie

Ein Epifluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 3.3), sowie weitere nachfolgend beschriebene Fluoreszenzmikroskoptypen, nutzt die Wellenlängenverschiebung zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum von Fluorophoren aus. Je nach verwendetem Fluorophor wird hierzu ein geeigneter Anregungswellenlängenbereich mittels einer Weißlichtquelle mit einem geeignetem Anregungsfilter, einer LED-Lichtquelle oder eines Lasers realisiert. Ein wellenlängenabhängiger Dichroit fungiert als Strahlteiler und reflektiert das Anregungslicht auf die hintere Apertur eines Objektivs, in dessen Fokus die zu untersuchende Probenebene positioniert wird. Der Anregungsstrahl vor dem Objektiv wird hierbei aufgeweitet, um eine möglichst gleichmäßige Ausleuchtung des detektierten Bereichs in der Probe zu ermöglichen. Die räumlich isotrope Emission an Fluoreszenzlicht der angeregten Fluorophore in der Probe wird nun über dasselbe Objektiv gesammelt und passiert erneut den Strahlteiler. Aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit kann bei geeigneter Wahl des Strahlteilers das rotverschobene Fluoreszenzsignal diesen passieren, während gestreutes Anregungslicht reflektiert wird. Ein zusätzlicher Detektionsfilter nach dem Dichroit kann bei Bedarf übriges Anregungslicht blocken und den detektierten Wellenlängenbereich selektieren. Das Fluoreszenzlicht wird nun mithilfe einer Sammellinse auf einem Kamerasensor abgebildet und gibt so über das lokale Fluoreszenzsignal die räumliche Verteilung von Fluorophoren in der Probenebene wieder. Durch diese Methode sind sehr schnelle zweidimensionale Fluor-

reszenzaufnahmen in der Probenebene möglich. Jedoch tritt durch die Anregung und Detektion von Fluorophoren auch unter- und oberhalb der Probenebene in dreidimensional ausgedehnten Proben ein starkes Hintergrundsignal auf, welches den Kontrast der Aufnahmen stark verringern kann. Eine Fluoreszenzanregung außerhalb der Probenebene bedeutet auch insbesondere für lebende Organismen potentiellen, zusätzlichen Photostress.



**Abb. 3.3: Skizze eines Epifluoreszenzmikroskops**

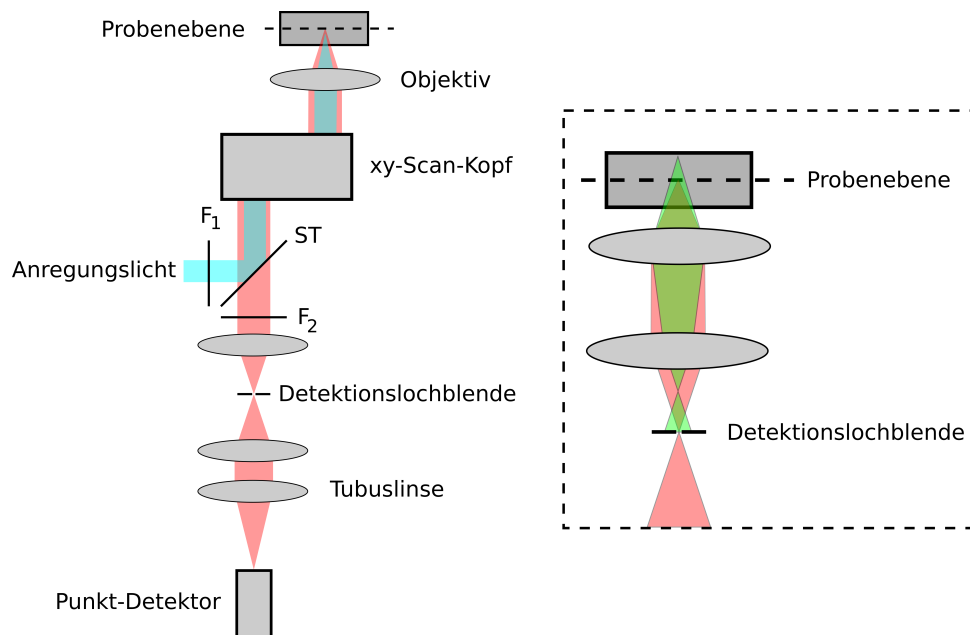
Das Anregungslicht (blau) wird über einen Filter  $F_1$  auf das Anregungsspektrum des verwendeten Fluorophors angepasst und nach der Reflektion an einem Strahlteiler  $ST$  durch das Objektiv auf die Probe geführt. Hierbei wird darauf geachtet das komplette abgebildete Gesichtsfeld der Probenebene gleichmäßig auszuleuchten. Die so angeregte Fluoreszenz wird über das gleiche Objektiv gesammelt und kann aufgrund der Stokes-Verschiebung den Strahlteiler passieren, wobei zurückgestreutes Anregungslicht wieder reflektiert wird. Eine zusätzliche Filterung über einen Detektionsfilter  $F_2$  blockt übriges Anregungslicht. Das Signal wird nun über eine Tubuslinse auf einen Kameradetektor abgebildet.

#### 3.1.4. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und Spinning-Disk-Mikroskopie

In einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* (**CLSM**, *confocal laser scanning microscope*) wird ein im Idealfall beugungsbegrenztes fokales Volumen in einem Punkt der Probe angeregt und das emittierte Fluoreszenzsignal der Fluorophore in diesem Probenvolumen über einen Punktdetektor erfasst (siehe linke Skizze in Abb. 3.4). Hierfür wird zunächst das Anregungslicht (im Regelfall eines Lasers) durch das Objektiv in die Probe eingebracht. Fluoreszenz kann so sowohl im Fokus als auch über- und unterhalb angeregt werden. Die vom Objektiv detektierten Photonen bestehen aus gestreutem Anregungslicht und den von der Probe emittierten Photonen. Diese werden, vergleichbar zu einem Epifluoreszenzmikroskop, über einen Dichroiten und einen Detektionsfilter, die nur das wellenlängenverschobene Fluoreszenzsignal bzw. einen gewählten Spektralbereich transmittieren, getrennt. In neueren CLS-Mikroskopen kann eine wellenlängenabhängige Detektion auch über den Einsatz von Prismen erfolgen. Das Fluoreszenzsignal wird auf ein **Pinhole** (deutsch: Lochblende) sehr geringen Durchmessers fokussiert, was dazu führt, dass emittierte Photonen außerhalb der Fokusebene unterdrückt werden. Anregung und Detektion haben so einen gemeinsamen Fokus (siehe rechte Skizze in Abb. 3.4),



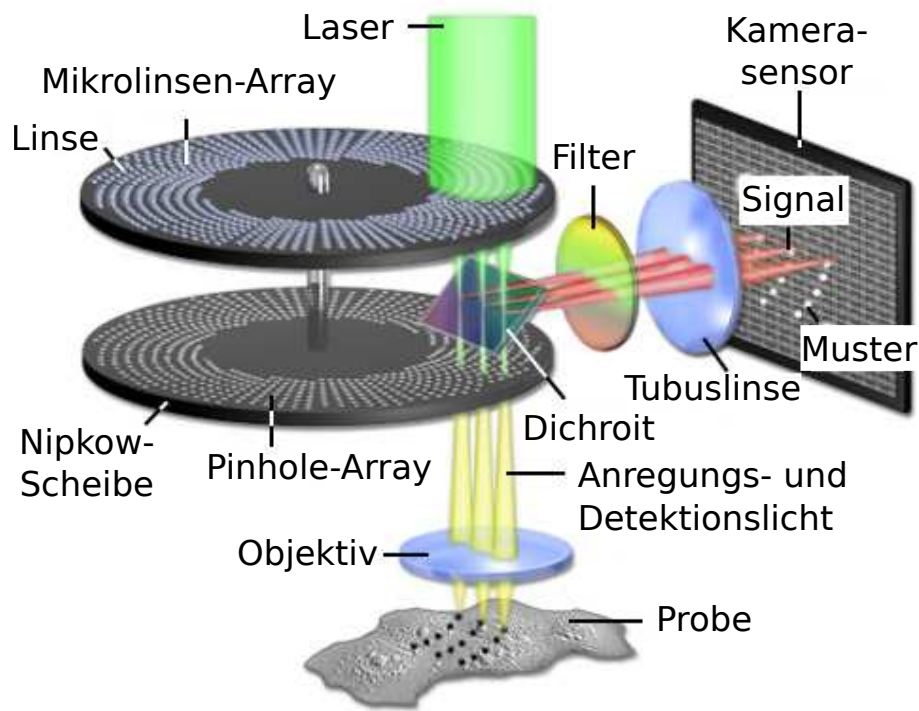
was dem Messprinzip seinen Namen gibt. Durch variable Einstellungen der *Pinhole*-Größe kann so die detektierte Intensität und Tiefendiskriminierung der Aufnahmen variiert und der Kontrast und die räumliche Auflösung unter einem Verlust an Signalstärke gesteigert werden. Im weiteren Strahlverlauf wird das Detektionssignal von einem Punktdetektor erfasst. Eine räumliches Abrastern der Probe erfolgt über eine zweidimensionale Anordnung von Scan-Spiegeln im Strahlengang, die das Anregungs- und Detektionsvolumen in der Probe verschieben und so die Aufnahme eines zweidimensionalen Bildes ermöglichen. Die Prozedur des Abrasterns kann dabei je nach gewählten Aufnahmeparametern einige Zeit in Anspruch nehmen. Zudem kann dies durch eine hohe Energieeinbringung in die Probe aufgrund eines Ausbleichens der Fluorophore und phototoxischer Effekte bei lebenden Proben problematisch für Langzeitaufnahmen sein.



**Abb. 3.4: Skizze eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops**

Ähnlich zum Epifluoreszenzmikroskop erfolgt eine wellenlängenabhängige Unterscheidung zwischen Anregung und Detektion des Fluoreszenzsignals über einen Strahlteiler. Die Anregung erfolgt über einen beugungsbegrenzten Fokus in der Probenebene, der zur Bildaufnahme mittels eines ansteuerbaren Spiegelpaares im xy-Scan-Kopf über die Probe gefahren wird. Zusätzlich ist im Detektionsstrahlengang eine Detektionslochblende (*Pinhole*) verbaut, auf die das detektierte Signal fokussiert wird. Je nach Durchmesser der Lochblende kann emittiertes Signal außerhalb der Probenebene (im rechten Teil der Abbildung grün gekennzeichnet) unterdrückt werden, um damit die Tiefendiskriminierung und den Kontrast der Aufnahme zu steigern.

Eine weitere Implementierung der konfokalen Mikroskopie stellt die sogenannten Spinning-Disk (**SD**) Mikroskopie dar. Hierbei werden mehrere Anregungs- und Detektionsvolumina über zwei Nipkow-Scheiben mit je einer Anordnung von Mikrolinsen und von fixen *Pinholes* erzeugt. Das so gesammelte Signal mehrerer Untervolumina in der Probe wird wieder zunächst über einen Dichroiten zwischen den Nipkow-Scheiben und einen Detektionsfilter wellenlängenabhängig selektiert und über einen Kamerasensor aufgenommen. Durch die Art der Anordnung auf den Nipkow-Scheiben und eine Rotation derselben wird so über eine Integrationszeit des Sensors, die mit der Rotationsgeschwindigkeit der Scheiben synchronisiert werden muss, jeder Punkt im detektierten Bildausschnitt überstrichen und so ein vollständiges Bild der Probenebene aufgenommen (siehe Abb. 3.5). Dies führt zu einer erhöhten Aufnahmegeschwindigkeit bei ansonsten vergleichbarer Auflösung zur Rastermethode eines *CLSM*. Jedoch erfolgt auch hier die Anregung



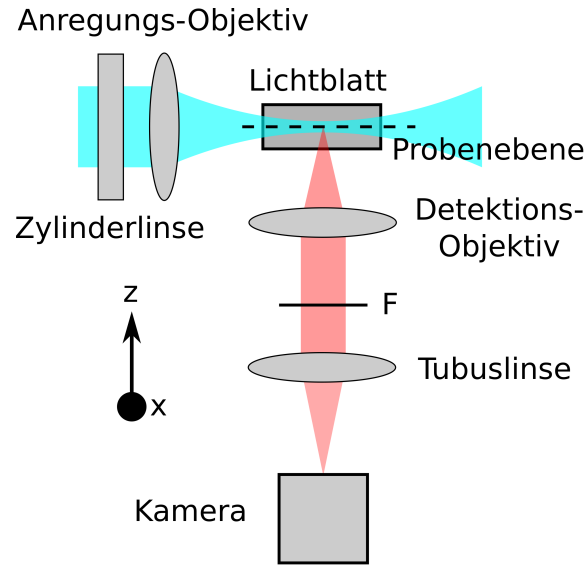
**Abb. 3.5: Prinzip einer Spinning-Disk-Aufnahme**

Für die Aufnahme wird der kollimierte Anregungslaserstrahl zunächst über ein Array an Mikrolinsen auf der ersten SD-Scheibe auf das *Pinhole-Array* der zweiten Scheibe fokussiert und erzeugt über das Objektiv ein Muster an Anregungsfoki in der Probe. Die dort angeregte Fluoreszenz wird wieder über das Objektiv gesammelt, wobei durch das *Pinhole-Array* nun eine Tiefendiskriminierung nach dem konfokalen Prinzip erfolgt. Ein Dichroit als Strahlteiler reflektiert das Emissionslicht durch einen zusätzlichen Filter auf eine Tubuslinse. Diese bildet das Signal auf einem Kamerasensor ortsabhängig ab. Durch eine gemeinsame Rotation der beiden SD-Scheiben erfolgt eine Abtastung der gesamten Probe während der Integrationszeit des Kamerasensors. *Abbildung nach [63]*

von Fluorophoren außerhalb der Probenebene mit den damit verbundenen potentiell schädlichen Auswirkungen auf die Probe.

### 3.1.5. Lichtblattmikroskopie

Die Lichtblattmikroskopie, auch Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie, *lightsheet fluorescence microscopy (LSFM)* oder *selective / single plane illumination microscopy (SPIM)* genannt, ist ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren, bei dem ein Lichtblatt mit einer Taille im Bereich von einigen  $\mu\text{m}$  in der Fokalebene eines Detektionsobjektivs erzeugt wird. Die so im Lichtblatt angeregte Fluoreszenz kann über das Objektiv detektiert werden und ist weitestgehend frei von Hintergrundsignal außerhalb der Fokalebene, welches bei den zuvor genannten Mikroskopieverfahren unerwünschterweise angeregt und teilweise auch detektiert wird. Hierdurch wird in einer SPIM-Aufnahme zum einen ein erhöhter Kontrast der Aufnahmen erreicht, zum anderen aber insbesondere unerwünschtes *Bleaching* und Photostress in Ebenen außerhalb der aufgenommenen Fokalebene unterdrückt. Die angeregte Ebene kann detektionsseitig über einen Filter von gestreutem Anregungslicht bereinigt und mittels eines Kamerasensors als zweidimensionales Bild aufgenommen werden. Damit verbindet diese Technik die schnelle Bildaufnahme eines



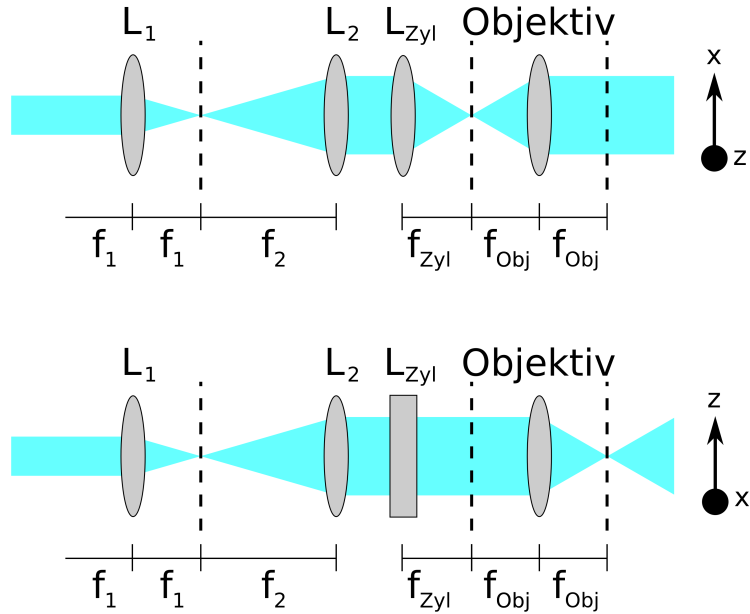
**Abb. 3.6: Skizze eines Lichtblattmikroskops mit zwei Objektiven**

Zunächst wird ein kollimierter Laserstrahl über eine Zylinderlinse in einer Richtung  $x$  senkrecht zur Zeichenebene fokussiert, während die zweite Dimension  $z$  kollimiert bleibt. Nach dem Anregungsobjektiv entsteht so ein in  $z$  fokussiertes Lichtblatt mit einer endlichen Ausdehnung in  $x$ . Die in der Probe durch das Lichtblatt angeregte Fluoreszenz kann über ein zweites Objektiv detektiert werden und nach einem Filter zum Blocken gestreuten Anregungslichts durch die Tubuslinse auf den Kamerasensor abgebildet werden. Die Lichtblattposition wird bei der Justage auf die fokale Ebene des Detektionsobjektivs ausgerichtet.

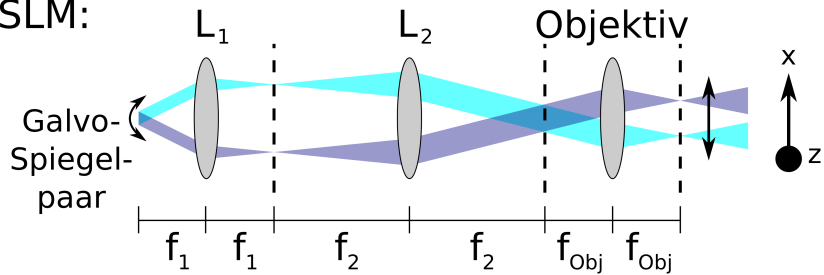
Epifluoreszenzmikroskops mit der Tiefendiskriminierung eines konfokalen Aufbaus bei stark reduziertem Photostress für die Probe. Über eine Verschiebung der Probe zum Lichtblatt und der Fokalebene oder ein gemeinsames Verschieben des Lichtblatts und der Fokalebene zur Probe können schnelle und schonende 3D-Schichtaufnahmen (**Stacks**) einer Probe erstellt werden. Die so erreichbare hohe räumliche und zeitliche Auflösung der aufgenommenen Bilder bei hohem Kontrast und niedriger Energieeinbringung in die Probe hat die Lichtblattmikroskopie in den letzten Jahren insbesondere für *in vivo* Aufnahmen an anfälligen entwicklungsbiologischen Proben interessant gemacht. Die Methode basiert auf dem Ultra-Mikroskop von Zsigmondy und Siedentopf im Jahre 1903 [64]. 1993 wurde die Methode durch Voie et al. auf fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an biologischen Proben erweitert [65]. Diverse weitere Implementierungen bezüglich der Lichtblattformung und der Detektion sowie erste Verwendungen in der Entwicklungsbiologie sind innerhalb des letzten Jahrzehnts erschienen [66–77]. Hierbei wurden sowohl Probleme durch Abschattungseffekte des Lichtblatts, Streuung und Aberrationen in Anregung und Detektion durch die Verwendung von mehreren Objektiven für Anregung und Detektion, Probenrotation, der Verwendung von Bessel- oder Airystrahlen, strukturierter Beleuchtung, adaptiver Optik oder *Clearing*-Verfahren behoben und somit Auflösung, Aufnahmegeschwindigkeit und Probenschonung optimiert. Für weitere Details zu typischen bzw. lichtblattspezifischen Abbildungsfehlern, wie Aberrationen und die Entstehung von Streifen-Artefakten, siehe z.B. [38, 78]. Die Anzahl und Anordnung der verwendeten Objektive sowie die Erzeugung des Lichtblatts ist ein auszeichnendes Charakteristikums der unterschiedlichen Lichtblattmikroskoptypen. Für eine aktuelle Übersicht unterschiedlicher Implementierung und neuer Entwicklungen sei z.B. auf [69, 79] verwiesen. Das Lichtblatt kann sowohl statisch über die Verwendung einer Zylinderlinse oder aus einer Kombination einer Zylinderlinse und eines Anregungsobjektivs geformt werden [66], als auch dynamisch über das schnelle Verfahren eines Gauß-, Bessel- oder

Airy-Strahls in einer Dimension während der Integrationsdauer des Kamerasensors [68] (siehe Abb. 3.7). Die letztgenannte Technik wird dementsprechend auch als **DSLM** (*digital scanned lightsheet microscopy*) bezeichnet.

### Zylinderlinse:



### DSLM:



**Abb. 3.7: Unterschiedliche Arten der Lichtblatterzeugung**

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Lichtblatterzeugung über eine Zylinderlinse und ein Anregungsobjektiv in zwei Dimensionen. Zunächst wird ein kollimierter Strahl nach dem Teleskopprinzip aufgeweitet und in  $x$  auf die hintere Objektivapertur fokussiert. Die dafür notwendigen Brennweitenabstände  $f_{1,2,zyl,obj}$  der Optiken sind entsprechend eingezeichnet. Die Zylinderlinse bildet mit der Objektiv-Linse in  $x$  erneut einen Teleskopaufbau und sorgt somit für eine endliche Breite des Lichtblatts in  $x$ . Durch die Fokussierung des Objektivs in  $z$  kann eine dünne Taille des Lichtblatts in  $z$  entstehen und für die selektive Anregung der Fluoreszenz in einer Ebene verwendet werden. Die DSLM-Technik basiert auf dem schnellen Verfahren eines Gaußstrahls in  $x$ . Dies erfolgt über die Auslenkung des Strahls über einen Galvospiegel. Die Ablenkung wird über zwei Sammellinsen in der hinteren Brennebene des Objektivs abgebildet. Die verwendeten Optiken müssen hierbei in ihren jeweiligen Brennweiten-Abständen voneinander positioniert werden. Durch das schnelle Verfahren des Gauß-Strahls während der Integrationszeit der Kamera entsteht für die Messdauer ein Lichtblatt endlicher Ausdehnung in  $x$  und einer Taillecke entsprechend der Fokussierung des Strahls in  $z$ . Die Ausdehnung in  $x$  kann hierbei über den Winkelbereich der Strahlablenkung durch den Galvospiegel vorgegeben werden.

### 3.1.6. Auflösung und Lichtblattdicke

#### Auflösung in Fluoreszenzmikroskopen

Unter der Auflösung eines optischen Systems [80, 81] versteht man den minimalen räumlichen Abstand unterschiedlicher Strukturen innerhalb dessen eine Differenzierung dieser noch möglich ist. In der Lichtmikroskopie ist der limitierende Faktor der Wellencharakter des Lichts und die daraus resultierende Beugungserscheinung. So werden selbst ideale Punktlichtquellen aufgrund der Beugung an der Apertur der verwendeten Optik nach dieser als sogenannte Beugungs- bzw. Airyscheibchen dargestellt. Die Intensitätsverteilung einer solchen abgebildeten Punktlichtquelle ist durch die sogenannte Punktspreizfunktion (**PSF**) gegeben. Optische Elemente werden durch ihre **Numerische Apertur (NA)** beschrieben. Diese ist ein Maß für die Strahlfokussierung eines optischen Systems und ergibt sich aus dem Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Objektiv und Probe und dem halbem Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs mit  $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ . Das Auflösungsvermögen wird meist in Form der Halbwertsbreite **FWHM** (*full width half maximum*) oder der charakteristischen Längenskala  $\sigma_{xy,z}$  für einen Abfall auf  $1/e^2$  bezüglich der PSF angegeben. Für ein Weitfeldmikroskop mit einer homogenen Ausleuchtung der Probe und einer detektierten Wellenlänge  $\lambda$  lässt sich diese Größe numerisch abschätzen [38] zu

$$\sigma_{xy,WF} \approx 0,82 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.1)$$

$$\sigma_{z,WF} \approx 2,80 \frac{n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (3.2)$$

Für ein Konfokalmikroskop ergibt sich die Gesamt-PSF aus der Anregung mittels eines beugungsbegrenzten Profils und der PSF der Detektion, weshalb gilt:

$$PSF_{Konf} = PSF_{Anr} \cdot PSF_{Det} \approx PSF_{WF}^2 \quad (3.3)$$

Die Näherung beinhaltet eine Vernachlässigung des Wellenlängenunterschieds zwischen Anregung und Detektion. Durch die nun effektive Unterdrückung der Nebenmoden in der PSF lässt sich die  $PSF_{Konf}$  mit einem dreidimensionalen Gauß-Profil der Längenskala  $\sigma$  annähern, für das unter der vorherigen Näherung gilt:

$$\sigma_{Konf}^{-2} = \sigma_{Anr}^{-2} + \sigma_{Det}^{-2} \approx 2 \cdot \sigma_{Anr}^{-2} \quad (3.4)$$

Hiermit ergibt sich eine Auflösungsverbesserung im Vergleich zur Weitfeldmikroskopie um den Faktor  $\sqrt{2}$  bzw. eine Verringerung der PSF-Größe um den Faktor  $1/\sqrt{2}$ . Eine Numerische Näherung ergibt eine Auflösung von

$$\sigma_{xy,Konf} \approx 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.5)$$

$$\sigma_{z,Konf} \approx 2,09 \frac{n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (3.6)$$

In einem Lichtblattmikroskop ergibt sich die  $PSF_{SPIM}$  wieder aus dem Anregungs- und Detektions-Profil:

$$PSF_{SPIM} = PSF_{Anr} \cdot PSF_{Det} \quad (3.7)$$

Hierbei ist die Verwendung unterschiedlicher Objektive und die senkrechte Ausrichtung der beiden PSF zueinander zu berücksichtigen. Die effektive Auflösung lässt sich so abschätzen zu:

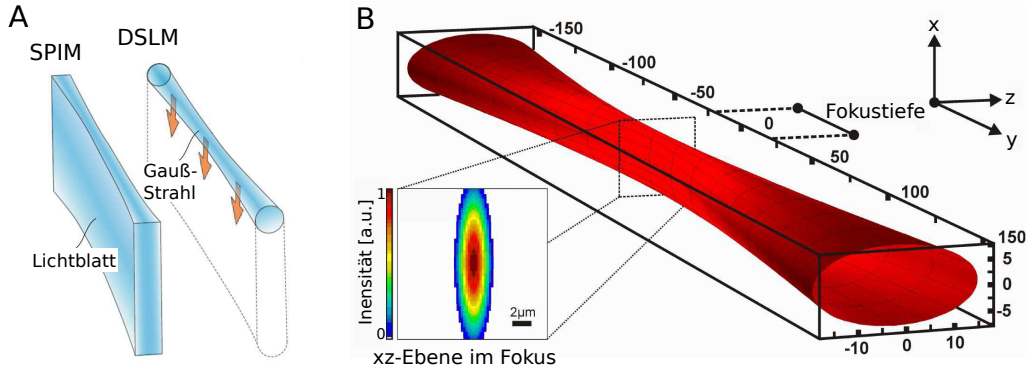
$$\sigma_{xy,SPIM} = \sigma_{xy,Det} = \sigma_{xy,WF} \quad (3.8)$$

$$\sigma_{z,\text{SPIM}} = \frac{1}{\sqrt{\sigma_{z,\text{Det}}^{-2} + \sigma_{z,\text{Anr}}^{-2}}} \quad (3.9)$$

Hiernach ergibt sich keine Auflösungsverbesserung in lateraler Ausdehnung im Vergleich zum Weitfeldmikroskop, während der Auflösungsgewinn in axialer Dimension von der Ausdehnung des Lichtblatts in  $z$  abhängt. Aufgrund der Entkopplung von  $\sigma_{\text{Anr}}$  und  $\sigma_{\text{Det}}$  durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Objektive zur Anregung und Detektion kann die axiale Auflösung hier durch die Lichtblattdicke variiert werden. Im Falle einer Verwendung eines Anregungsprofils in  $z$  mit vergleichbarer Ausdehnung zur axialen Detektions-PSF kann dies so zu einer zur konfokalen Mikroskopie vergleichbaren Auflösungsverbesserung um den Faktor  $\sqrt{2}$  im Vergleich zur Weitfeldaufnahme führen.

### Lichtblattdicke

Die Annahme eines konstanten Beleuchtungsprofils und damit auch einer homogenen axialen Auflösung nach Gl. 3.9 ist sowohl für ein statisches Lichtblatt als auch für ein geschriebenes Lichtblatt nur in einer begrenzten Fläche bzw. Ausdehnung in der Strahlausbreitungsrichtung  $y$  im Fokus des Lichtblatts haltbar (siehe Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Lichtblattintensitätsprofil**

(A) Zu sehen sind Skizzen des statischen Lichtblatt durch die Verwendung einer Zylinderlinse mit einem Objektiv und das entstehende Lichtblatt eines gescannten Gauß-Strahl im DSLM-Ansatz. *Abbildung nach [82]* (B) Das statische Lichtblatt weist ein Gaußprofil unterschiedlicher Längenskalen in  $x$  und  $z$  in Abhängigkeit von  $y$  auf. *Abbildung nach [83]*

Entlang der Strahlausbreitungsrichtung  $y$  kann die Lichtblattdicke  $\sigma_{z,\text{Anr}}$  gemäß der Form eines Gaußstrahls (siehe Abb. 3.9) beschrieben werden als

$$\sigma_{z,\text{Anr}}(y) = \sigma_{z,\text{Anr},0} \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{y}{y_R}\right)^2} \quad (3.10)$$

Hierbei gibt  $\sigma_{z,\text{Anr},0}$  die Lichtblattdicke in der Taille an, während  $y_R$  als Rayleighlänge die Längenskala für eine Tailen-Vergrößerung um den Faktor  $\sqrt{2}$  angibt. Die minimale Taille  $\sigma_{z,\text{Anr},0}$  lässt sich abschätzen zu

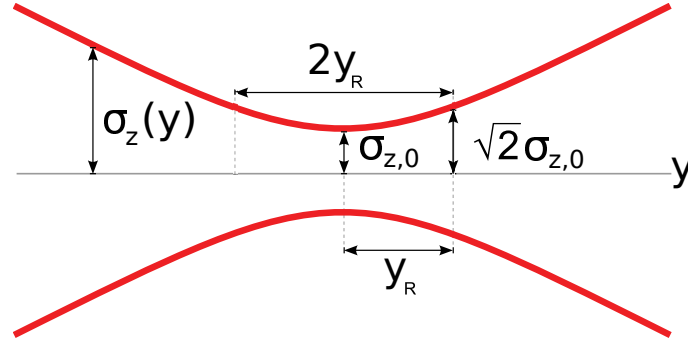
$$\sigma_{z,\text{Anr},0} = \frac{n \cdot \lambda_{\text{Anr}}}{\pi \cdot NA} \quad (3.11)$$

für einen Brechungsindex  $n$  des Mediums, einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Anr}}$  und der Numerischen Apertur  $NA$  des verwendeten Objektivs. Die Rayleighlänge lässt sich so ebenfalls ermitteln, mit

$$y_R = \frac{\pi \cdot \sigma_{z,\text{Anr},0}^2}{\lambda_{\text{Anr}}} \quad (3.12)$$

Innerhalb des Bereichs  $2y_R$  kann demnach von einer ungefähr gleichmäßigen Lichtblattdicke ausgegangen werden. Demnach kann unter Berücksichtigung der zur Aufnahme verwendeten Region die Ausdehnung des Lichtblatts und damit auch die axiale Auflösung nach Gl. 3.9 entsprechend angepasst werden.

Die Ausleuchtung in  $x$  ist nur für den DSLM-Ansatz entlang des Strahlverfahrbereichs tatsächlich homogen, während ein statisches Lichtblatt auch hier einen Gauß-Verlauf annimmt (siehe B in Abb. 3.8). Über eine geeignete Brennweitenkombination der Zylinderlinse und des Anregungsobjektivs lässt sich dies ebenfalls mit einer ausreichend großen Rayleighlänge in  $x$  kompensieren.



**Abb. 3.9: Lichtblattdicke**

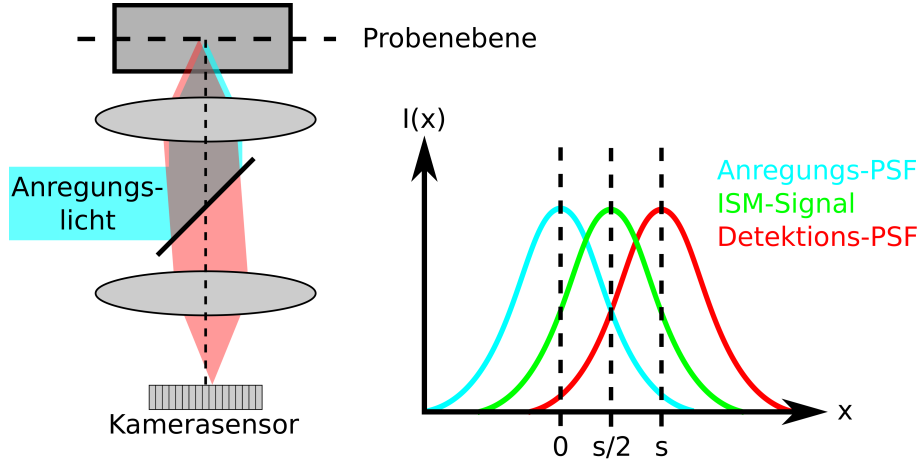
Das Anregungsprofil in  $z$  entlang der Strahlausbreitungsrichtung  $y$  kann als Gauß-Strahl angenommen werden. Die Dicke des Strahls  $\sigma_z(y)$  wächst in Entfernung zur Lichtblatttaille gemäß Gl. 3.10. Der zur Bildaufnahme verwendete Bereich in  $y$  umfasst so meist die Abmessung  $2y_R$ .

### 3.1.7. Image scanning microscopy

Eine Möglichkeit zur Steigerung der lateralen Auflösung konfokaler Fluoreszenzmikroskopie-aufnahmen, die auch in dieser Arbeit Verwendung findet, ist die sogenannten *image scanning microscopy* (ISM) [84–87]. Das Grundprinzip basiert hierbei auf einer konfokalen Mikroskopie-aufnahme in Zusammenhang mit der Detektion des Signals auf einem Kamerasensor anstelle eines üblicherweise verwendeten Punktdetektors. Der Herleitung nach [86] folgend, kann die am Detektor gemessene Intensität  $I(\vec{r}, \vec{s})$  in Abhängigkeit zur Ortskoordinate  $\vec{r}$  der gemessenen Probenstelle und der Pixelkoordinate  $\vec{s}$  auf dem Detektor beschrieben werden als

$$I(\vec{r}, \vec{s}) = \int A(\vec{s}) \cdot \text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r} - \vec{r}' + \vec{s}) \cdot \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r} - \vec{r}') \cdot C(\vec{r}') d\vec{r}' \quad (3.13)$$

Hierbei sind  $A(\vec{r})$  die Blendenfunktion des *Pinholes*,  $\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r})$  die Punktspreizfunktionen der Detektion und  $\text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r})$  das Anregungsprofil des Systems.  $C(\vec{r})$  steht hier für die ortsabhängige Dichte von Emittlern in der Probe. Eine Integration über  $\vec{s}$  ergibt so das Bild einer typischen konfokalen Aufnahme, während ein Verschieb der Datenpunkte bzgl.  $\vec{r}$  um den jeweiligen Vektor  $\vec{s}$  und eine nachfolgende Integration nach  $\vec{s}$  das Bild einer Weitfeldaufnahme reproduzieren würde. Für einen Emittter bei  $\vec{r} = 0$  liegt das Zentrum der Verteilung  $\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r} - \vec{r}' + \vec{s}) \cdot \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r} - \vec{r}')$  für einen Pixel an der Position  $\vec{s}$ , unter Vernachlässigung der Stokesverschiebung zwischen Anregung und Detektion, an der Stelle  $\frac{\vec{s}}{2}$  (siehe Abb. 3.10). Die ISM-Methode basiert nun darauf, das Zentrum der Intensitätsverteilungen für die von der optischen Achse abweichenden Pixelpositionen zurück auf die optische Achse zu verschieben. Eine Integration über  $\vec{s}$  ergibt dann



**Abb. 3.10: ISM-Prinzip**

Wird das Detektionssignal einer beugungsbegrenzten Anregung über einen Bildsensor aufgenommen, so ist die entstehende PSF für Pixel mit einer Distanz  $s$  zur optischen Achse um die Länge  $\frac{s}{2}$  verschoben. Durch eine Verschiebung der  $\text{PSF}_{\text{ISM}}$  dieser Pixel zurück auf die optische Achse und einer anschließenden Fourier-Filterung kann so das laterale Auflösungsvermögen gesteigert werden.

einen Intensitätswert in Abhängigkeit der Fokusposition  $\vec{r}$  mit :

$$I_{\text{ISM}}(\vec{r}) = \int I(\vec{r} - \frac{\vec{s}}{2}, \vec{s}) d\vec{s} = \int \int A(\vec{s}) \cdot \text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r} - \vec{r}' + \frac{\vec{s}}{2}) \cdot \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r} - \vec{r}' - \frac{\vec{s}}{2}) \cdot C(\vec{r}') d\vec{s} d\vec{r}' \quad (3.14)$$

Hierdurch trägt für eine Messung an der Fokusposition  $\vec{r}$  das an der Kameraposition  $\vec{s}$  detektierte Signal bei der Bildrekonstruktion nun zur Position  $\vec{r} + \frac{\vec{s}}{2}$  bei. Dadurch ergibt sich eine effektive  $\text{PSF}_{\text{ISM}}(\vec{r})$  nach

$$\text{PSF}_{\text{ISM}}(\vec{r}) = \int A(\vec{s}) \cdot \text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r} + \frac{\vec{s}}{2}) \cdot \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r} - \frac{\vec{s}}{2}) d\vec{s} \quad (3.15)$$

Es lässt sich zeigen [85, 86], dass dies zu einer effektiven Erhöhung der lateralen Auflösung im Vergleich zu einer Weitfeldaufnahme führt. Dies ist zurückzuführen auf den vergrößerten Bereich an Frequenzen der optischen Transferfunktion (**OTF**), also der Fourier-Transformation der PSF, der sich nun verdoppelt. Aufgrund der nun stärkeren Dämpfung bzw. Untergewichtung hoher Frequenzen, führt dies jedoch zunächst nur zu einer theoretischen Verbesserung der PSF um den Faktor 1,5. Dies wird kompensiert über eine Fourier-Umgewichtung mittels einer Gewichtungsfunktion  $\tilde{W}(\vec{q})$  im fouriertransformierten Raum der Form

$$\tilde{W}(\vec{q}) = \frac{1}{\widetilde{\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{q}/2)} + \epsilon} \quad (3.16)$$

mit der fouriertransformierten Detektions-PSF  $\widetilde{\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{q})}$  und einem Normalisierungsparameter  $\epsilon$ , der die Grenzfrequenz der Filterfunktion widerspiegelt und mindestens eine Größenordnung kleiner sei als die maximale Amplitude  $|\widetilde{\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{q})}|$ . Hierdurch lässt sich letztendlich eine theoretische Verbesserung der lateralen Auflösung um den Faktor 2 erreichen [85, 86]. Dies ist vergleichbar mit einer konfokalen Mikroskopieaufnahme mit einer unendlich kleinen Detektionsapertur. Dies würde in einer realen Messung aber auch zu einer verschwindenden Signalstärke führen, während bei ausreichender Größe des in der ISM-Aufnahme verwendeten Sensors und



ohne Detektionsblende das gesamte vom Objektiv gesammelte Signal detektiert wird. Um die axiale Auflösung eines Konfokalmikroskops und die Unterdrückung des Signals außerhalb der Fokusebene auch in einer ISM-Aufnahme gewährleisten zu können, ist es jedoch notwendig weiterhin eine Detektionsapertur in Form eines *Pinholes* zu verwenden, was die tatsächliche laterale Auflösungsverbesserung einer ISM-Aufnahme reduzieren kann.

Neben der Implementierung in einem klassischen CLSM [85] können ISM-Aufnahmen auch mit einem konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop realisiert werden [86], was auch in dieser Arbeit ausgenutzt wird. Hierfür werden Standbilder nicht überlappender *Pinhole*-Verteilungen mit einem Kamerasensor aufgenommen und nach obiger Methodik verrechnet. Über eine zeitlich verschobene, stroboskopartige Beleuchtung mittels Laserpulsen im  $\mu\text{s}$ -Bereich werden iterativ Standbilder der unterschiedlichen *Pinhole*-Verteilungen in der Probe erfasst und die Probenebene vollständig abgetastet. Das ISM-Bild kann so über die parallelisierte Messung der einzelnen *Pinhole*-Intensitätsverteilungen in wesentlich kürzerer Zeit als in einer CLSM-Aufnahme erstellt werden. Neuere Realisierungen der ISM-Technik beinhalten unter anderem die Erzeugung eines multifokalen Anregungsmusters durch den Einsatz digitaler Mikrospiegel (engl.: *digital micromirror device DMD*) [88], die Verwendung von 2-Photonen-Anregung [89, 90], sowie eine sofortige Bildrekonstruktion nach der ISM-Methode über die Optik des Aufbaus [89, 91].

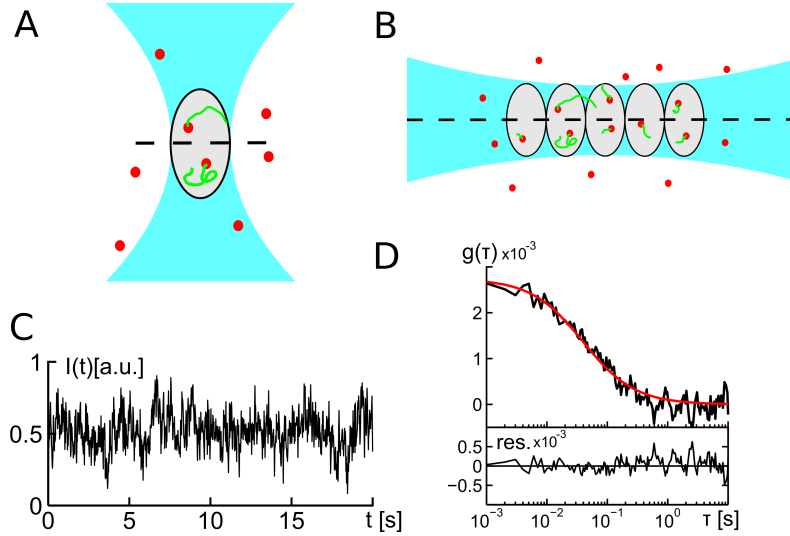
### 3.2. Messtechniken zur Diffusionsmessung

Dieses Unterkapitel beschreibt den theoretischen Hintergrund der in dieser Arbeit verwendeten Messtechniken zur Diffusionsmessung. Eine detaillierte Ausführung der an den Aufbauten realisierten experimentellen Implementierungen und der jeweiligen Datenauswertung erfolgt in den Kap. 6 und 9.

#### 3.2.1. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

In der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (**FCS**, *fluorescence correlation spectroscopy*) [92–95] werden die Intensitätsfluktuation einer zeitlichen Aufnahme der Fluoreszenzintensität in einem fokalem Volumen bekannter Dimensionen gemessen. Unter der Annahme, dass diese Fluktuationen auf die diffusive Bewegung fluoreszenzmarkierter Partikel, die das Detektionsvolumen  $V_{\text{Det}}$  betreten und verlassen, zurückzuführen ist (siehe Abb. 3.11), führt eine Autokorrelation der Intensität über die Zeit zu einer charakteristischen Zeitskala  $\tau_D$  des Abfalls der Autokorrelationsfunktion. Die Autokorrelation ist hierbei ein Maß für die Selbstähnlichkeit des zeitlichen Intensitätssignals für steigende Zeitabstände  $\tau$  und schwankt für unkorreliertes Rauschen um einen Nullwert. Diffusionsinduzierte, korrelierte Fluktuationen führen zu einer abfallenden Verlaufskurve entsprechend der Aufenthaltszeit der Teilchen im Detektionsvolumen. Diese Diffusionszeit  $\tau_D$  ermöglicht in Verbindung mit der Größe des Detektionsvolumens eine Abschätzung des Diffusionskoeffizienten  $D$  der markierten Teilchen. Erste FCS-Messungen in den 1970ern untersuchten so unter anderem die Diffusion von Farbstoffen in Lösung [92]. Voraussetzung für diese Art der Diffusionsmessung ist eine entsprechend niedrige Konzentration fluoreszenzmarkierter Teilchen, da das Verschwinden bzw. Auftauchen einzelner Partikel im Detektionsvolumen bei einer zu hohen Teilchenkonzentration ansonsten einen zu geringen Einfluss auf die zeitliche Intensitätskurve hat. Dies entspricht auch einem möglichst kleinen fokalen Volumen, um die Anzahl detektierter Teilchen gering zu halten. Zudem muss die Dynamik der Partikel ausreichend langsam sein bzw. die Zeitauflösung der aufgenommenen Intensitätskurve entsprechend hoch, um die Fluktuationen für Zeitabstände unterhalb der charakteristischen Zeitskala  $\tau_D$  registrieren zu können. Üblicherweise werden FCS-Messungen daher an einem konfokalen Mikroskop und unter Zuhilfenahme von zeitlich hochaufgelösten Punktdetektoren für die Fluoreszenzdetektion durchgeführt, wobei die Diffusion nur an einem fixen Ort in der Probe

gemessen wird. Räumlich ausgedehnte FCS-Messungen können z.B. durch sequenzielles Messen an mehreren Orten in der Probe oder unter teilweisem Verlust der Zeitauflösung durch iteratives Verfahren des Detektionsvolumens erreicht werden (*scanning-FCS*) [96, 97].



**Abb. 3.11: FCS-Prinzip**

(A) Fluoreszenzmarkierte Partikel (rot) können das beugungsbegrenzte Detektionsvolumen (grau) in einem konfokalen Mikroskop betreten und verlassen, was als Intensitätsfluktuation in der aufgenommenen zeitlichen Signalkurve detektiert wird. (B) Neben der Anregung und Detektion eines einzelnen Detektionsvolumens können mittels eines Lichtblattmikroskops auch mehrere Volumina begrenzter Abmessungen in der Probenebene mit einem Kamerasensor detektiert und so parallelisierte FCS-Messungen durchgeführt werden. Über eine Autokorrelation  $g(\tau)$  des Intensitätssignals  $I(t)$  (C) kann die abfallende Autokorrelationskurve (D) mit einem entsprechenden Modell (rot) gefittet und die Zeitskala des Autokorrelationsabfalls ermittelt werden. Bei Kenntnis der Größe des Detektionsvolumens kann hieraus der Diffusionskoeffizient bestimmt werden.

### FCS-Theorie

Davon ausgehend, dass sich die Anzahl detektierter Teilchen  $N(t)$  im Detektionsvolumen aus der Summe  $N(t) = \langle N \rangle_t + \delta N(t)$  mit einem zeitlichen Mittelwert  $\langle N \rangle_t$  und den Fluktuationen  $\delta N(t)$  ergibt und die detektierte Fluoreszenz  $I(t)$  proportional zur Teilchenzahl  $N(t)$  skaliert, ergibt sich für das gemessene Signal  $I(t) = \langle I \rangle_t + \delta I(t)$ . Hierbei sei angemerkt, dass das zeitliche Mittel der Fluktuationen Null ist, also  $\langle \delta I(t) \rangle_t = 0$  gilt. Die Autokorrelation  $g(\tau)$  für einen bestimmten Zeitabstand  $\tau$  lässt sich nun schreiben als

$$g(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle_t}{\langle I \rangle_t^2} = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle_t}{\langle I \rangle_t^2} - g_\infty \quad (3.17)$$

mit dem Korrelations-Offset  $g_\infty$ . Die Amplitude der Autokorrelation für  $\tau = 0$  ergibt zudem das zeitliche Mittel der Partikelkonzentration nach

$$g(\tau = 0) = \frac{\langle \delta I(t)^2 \rangle_t}{\langle I \rangle_t^2} \sim \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle_t}{\langle N \rangle_t^2} = \frac{1}{\langle N \rangle_t}, \text{ mit } \langle \delta N(t)^2 \rangle_t \equiv \text{Var}(N(t)) = \langle N \rangle_t \quad (3.18)$$

Die hier verwendete Beziehung  $\langle \delta N(t)^2 \rangle_t \equiv \langle N \rangle_t$  folgt aus der Annäherung der Partikel-Verteilung als Poisson-Verteilung. Die gemessenen Intensitätsfluktuationen  $\delta I(t)$  ergeben sich so

nach

$$\delta I(t) = \kappa \int \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r}) * \text{CEF}(\vec{r}) \cdot \delta C(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (3.19)$$

mit der Detektor-Effizienz  $\kappa$ , dem räumlichen Beleuchtungsprofil der Anregung  $\text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r})$  und der sogenannten **collection efficiency function**  $\text{CEF}(\vec{r})$ , die eine Faltung der Punktspreizfunktion des Detektionssystems  $\text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r})$  und der *Pinhole*-Funktion  $A(\vec{r})$  darstellt:

$$\text{CEF}(\vec{r}) = \int \text{PSF}_{\text{Det}}(\vec{r}) * A(\vec{r}) d\vec{r}$$

$\delta C(\vec{r}, t)$  charakterisiert die Fluktuationen der Teilchenanzahlkonzentration im Detektionsvolumen. Der zeitliche Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz ergibt sich analog zu

$$\langle I(t) \rangle_t = \kappa \langle C \rangle_t \int \text{PSF}_{\text{Anr}}(\vec{r}) * \text{CEF}(\vec{r}) \cdot d\vec{r} \quad (3.20)$$

mit einer zeitlich gemittelten Teilchenanzahlkonzentration  $\langle C \rangle_t$ . Diese lässt sich für Brownsche Bewegung in drei Dimensionen angeben als

$$C(\vec{r}, \tau) = \frac{\langle C \rangle_t}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{(\vec{r})^2}{4D\tau}} \quad (3.21)$$

Das Anregungsprofil in einem konfokalem Laser-Scanning Mikroskop kann in lateraler Dimension als Gaußprofil und in axialer Dimension als Lorentz-Profil der Form

$$\text{PSF}_{\text{Anr}} = I_0 \frac{r_0^2}{r(z)^2} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r(z)^2}} \quad (3.22)$$

angenommen werden. Hierbei wird die minimale Strahlausdehnung  $r_0 = (\lambda_{\text{Anr}} \cdot f) / n\pi r_1$  über die Laserwellenlänge  $\lambda_{\text{Anr}}$ , dem Brechungsindex  $n$  der Probe, dem Brennweitenabstand  $f$  der Objektivlinse und dem Strahlradius  $r_1$  vor dem Objektiv bestimmt. Die Faltung aus Anregungsprofil und CEF wird häufig auch als sogenannte *molecular detection efficiency* (**MDE**) bezeichnet und ergibt sich für ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop zu

$$\text{MDE}_{\text{Konf}}(\vec{r}) = I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\sigma_{xy}^2} - \frac{2z^2}{\sigma_z^2}}$$

unter Annahme eines gaußschen Detektionsvolumens der Ausmaße  $\sigma_{xy}$  und  $\sigma_z$ . Das Detektionsvolumen berechnet sich somit zu

$$V_{\text{Det, Konf}} = \frac{1}{\langle C \rangle_t} \frac{\int [(\text{MDE}_{\text{Konf}}(\vec{r}))^2 d\vec{r}]}{[\int (\text{MDE}_{\text{Konf}}(\vec{r}) d\vec{r})]^2} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot \sigma_{xy}^2 \cdot \sigma_z \quad (3.23)$$

Dies führt letztendlich für die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie bei dreidimensionaler Diffusion zu einer Autokorrelationskurve der Form

$$g_{\text{Konf}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle_t} \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D})} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left( \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_z} \right)^2}} \quad (3.24)$$

mit einer Diffusionszeit  $\tau_D$  in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D$  nach

$$\tau_D = \frac{\sigma_{xy}^2}{4 \cdot D} \quad (3.25)$$

Liegt mehr als eine Art an fluoreszenten Teilchen in der gemessenen Probe vor, kann die Autokorrelationskurve um die Anzahl  $n$  der Teilchenpopulationen erweitert werden nach

$$g_{\text{Konf,Poly}}(\tau) = \sum_{i=1}^n \frac{\rho_i}{\langle N_i \rangle_t} \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}})} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}} (\frac{\sigma_{xy}}{\sigma_z})^2}} \quad (3.26)$$

$\tau_{D,i}$  steht hierbei für die jeweiligen Diffusionszeiten der unterschiedlichen Teilchenpopulationen. Für die Anteile der Teilchenpopulationen  $\rho_i$  gilt:  $\sum_{i=1}^n \rho_i = 1$ .

Weicht das diffusive Verhalten der Teilchen von normaler Diffusion ab (Anomalieparameter  $\alpha \neq 1$ ), kann auch ein Modell für anomale Diffusion verwendet werden [49] mit

$$g_{\text{Konf,anomal}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle_t} \frac{1}{(1 + (\frac{\tau}{\tau_D})^\alpha)} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})^\alpha (\frac{\sigma_{xy}}{\sigma_z})^2}} \quad (3.27)$$

### Imaging FCS und SPIM-FCS

Da die Verwendung eines konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskops FCS-Messungen in der Regel nur in einem kleinen und räumlich stationären Detektionsvolumen erlaubt, wurden in den letzten Jahren auch vermehrt FCS-Implementierungen entwickelt, die parallelisierte FCS-Messungen an mehreren Orten in der Probe zur gleichen Zeit ermöglichen [96, 98, 99]. Eine Herausforderung hierbei ist die Begrenzung der einzelnen Detektionsvolumen auf kleine räumliche Ausdehnungen und das Erreichen einer zeitlichen Auflösung, die schnell genug ist, um den Abfall der Autokorrelationsfunktion erfassen zu können. Die Entwicklung neuer und schnellerer Kamerasensoren, die Bildaufnahmegeschwindigkeiten im Bereich von 10.000-20.000 fps (*frames per second*) erlauben, ermöglichen die Aufnahme von ortsabhängigen Intensitätsfluktuationen in der Probenebene in ausreichend hoher Geschwindigkeit. Die einzelnen Pixel der Kamera dienen hierbei als individuelle Lochblenden, der so räumlich separierten Detektionsvolumina, und können zudem über ein **Binning**, also einem Zusammenlegen von Pixeln entweder direkt bei der Aufnahme (**on-chip-Binning**) oder zu einem späterem Zeitpunkt bei der Auswertung (**digital Binning**) in ihren lateralen Ausdehnung variiert werden. In einem Lichtblattmikroskop kann durch eine geeignete Wahl der Optik ein Lichtblatt mit sehr geringer Dicke über einen kurzen Bereich generiert werden, um so FCS-Messungen zu ermöglichen [100–104] (siehe B in Abb. 3.11). Die selektive Ausleuchtung führt hierbei zu einer räumliche Begrenzung des Detektionsvolumens in axialer Ausdehnung. Andere Ansätze, wie z.B. die *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Mikroskopie können dies ebenfalls gewährleisten [105], sind in der Wahl der Messposition jedoch auf Ebenen beschränkt, die sich nur wenige 100nm oberhalb des Deckglases befinden, und erlauben so keine Messungen in tieferen Ebenen der Probe. Das Grundprinzip vom Imaging bzw. SPIM-FCS ist demnach identisch zu dem einer konfokalen FCS-Messung. Zunächst werden bei hoher Aufnahmegeschwindigkeit eine ausreichend große Anzahl an Bilder aufgenommen. Die zeitlichen Intensitätskurven der einzelnen Pixel werden autokorreliert und mit einem angepassten Fit-Algorithmus ausgewertet. Wichtig hierbei ist die Berücksichtigung des Einflusses der quadratischen Pixel auf die laterale Detektionspunktspreizfunktion und die entsprechende Auswirkung auf die **CEF** [38, 100] sowie des Anregungsprofils des Lichtblatts. Für den Kamerasensor gilt eine *Pinhole*-Funktion für Pixel der Seitenlänge  $a$  in der Bildebene von

$$A_{\text{Pixel}}(\vec{r}) = \begin{cases} 1 & , \text{ für } -\frac{a}{2} \leq (x, y) \leq \frac{a}{2} \\ 0 & , \text{ für } |(x, y)| > \frac{a}{2} \end{cases}$$

Die lichtblattspezifische Beschränkung der Anregung in  $z$  wird über die Annahme eines Gaußprofils in der Anregung der axialen Dimension berücksichtigt. Hierdurch ergibt sich letztendlich

eine MDE der Form:

$$\text{MDE}_{\text{SPIM}}(\vec{r}) = I_0 \cdot \frac{\left[ \text{erf}\left(\frac{a-2x}{\sqrt{2}\sigma_{xy}}\right) + \text{erf}\left(\frac{a+2x}{\sqrt{2}\sigma_{xy}}\right) \right] \cdot \left[ \text{erf}\left(\frac{a-2y}{\sqrt{2}\sigma_{xy}}\right) + \text{erf}\left(\frac{a+2y}{\sqrt{2}\sigma_{xy}}\right) \right]}{4 \left[ \text{erf}\left(\frac{a}{\sqrt{2}\sigma_{xy}}\right) \right]^2} \cdot e^{-\frac{2z^2}{\sigma_z^2}} \quad (3.28)$$

Dies führt für eine dreidimensionale Diffusion zu einer Autokorrelationsfunktion der Form:

$$g_{\text{SPIM},3\text{D}}(\tau) = \frac{V_{\text{Det},\text{SPIM}}}{\langle N \rangle} \frac{1}{a^2 \sqrt{\pi} \sigma_z \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\sigma_z^2}}} \cdot E(\tau) + g_\infty \quad (3.29)$$

mit

$$E(\tau) = \left[ \text{erf}\left(\frac{a}{l}\right) + \frac{l}{\sqrt{\pi}a} \left( e^{-\frac{a^2}{l^2}} - 1 \right) \right]^2 \quad (3.30)$$

und

$$l = \sqrt{4D\tau + \sigma_{xy}^2} \quad (3.31)$$

Die Detektionsfläche bzw. das Detektionsvolumen errechnen sich hierbei zu

$$V_{\text{Det},\text{SPIM}} = \sqrt{\pi} \sigma_z \cdot A_{\text{Det},\text{SPIM}} \quad (3.32)$$

und

$$A_{\text{Det},\text{SPIM}} = \frac{a^2}{\left[ \text{erf}\left(\frac{a}{\sigma_{xy}}\right) + \frac{\sigma_{xy}}{\sqrt{\pi}a} \left( e^{-\frac{a^2}{\sigma_{xy}^2}} - 1 \right) \right]^2} \quad (3.33)$$

Der Diffusionskoeffizient ergibt sich so aus

$$D = \frac{A_{\text{Det},\text{SPIM}}}{4 \cdot \tau_D} \quad (3.34)$$

Wie bereits für konfokale FCS-Messungen beschrieben, können auch Polydispersität und eine Anomalie der Diffusion in der Autokorrelationsfunktion berücksichtigt werden. Für den Fall einer zweidimensionalen Diffusion in der Lichtblattebene ergibt sich eine Autokorrelationsfunktion der Form

$$g_{\text{SPIM},2\text{D}}(\tau) = \frac{A_{\text{Det},\text{SPIM}}}{\langle N \rangle} \frac{1}{a^2} \cdot C(\tau) + g_\infty \quad (3.35)$$

### Konzentrationsbestimmungen in SPIM-FCS-Messungen

Bei der Bestimmung der Teilchenanzahl  $\langle N \rangle$  im Detektionsvolumen wurden in vergangenen Studien [102, 106] systematische Abweichungen von der realen Konzentration und den Ergebnissen konfokaler FCS-Messungen beobachtet. SPIM-FCS Messungen ergaben hier Konzentrationswerte, die 2-10 mal zu groß waren. Eichmessungen lieferten hierbei einen weitgehend lineare Überschätzung der gemessenen Konzentration bei einer Erhöhung der Probenkonzentration. Die Möglichkeit der Teilchenanzahlbestimmung aus der Autokorrelation ist an die Annahme gebunden, dass diese für einen Zeitabstand  $\tau = 0$  die Varianz der gemessenen Photonen von den Partikeln wiedergibt und diese Varianz dem Mittelwert entspricht (siehe Gl. 3.18), was für eine Poisson-Verteilung der Fall ist. Als mögliche Gründe hinter dem systematischen Fehler werden neben einer mangelnden Zeitauflösung bei schneller Diffusion auch, abhängig vom verwendeten Sensor, Kamera-Artefakte wie Rauschen oder *Afterpulsing* sowie eine Abweichung der erwarteten Poisson-Verteilung bei der Verwendung analoger Detektoren angeführt. Zudem führen

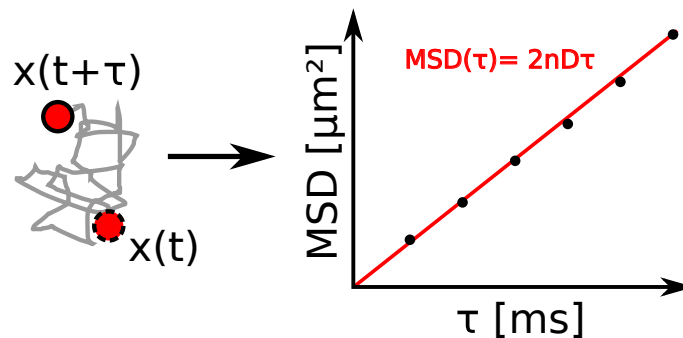
Abweichungen der tatsächlichen MDE, aufgrund der verwendeten Annahme eines Gaußprofils der Anregung, zu einer Unterschätzung des Detektionsvolumens bzw. einer Überschätzung der Teilchenkonzentration [38]. Eine Kompensation dieses Fehlers kann über Messungen an einer Eichprobe bekannter Konzentration und dem Abzug des Kamerahintergrunds durchgeführt werden [38, 102, 106, 107]. Eine Implementierung der angepassten MDE führt dazu, dass die Integrale nicht mehr analytisch gelöst werden können, und würden so zu einem enormen Anstieg des Rechenaufwands durch die nötigen numerischen Berechnungen führen. Bei nicht-homogenen Proben ist zudem die geeignete Wahl eines Signalhintergrunds während der Beleuchtung notwendig [107]. Innerhalb dieser Arbeit wird auf Konzentrationsbestimmungen aus SPIM-FCS-Messungen verzichtet.

### Weitere mögliche Fehlerquellen

Neben den bereits angesprochenen Fehlerquellen können Fluktuationen der Fluoreszenzemission bestimmter Fluorophore (*Blinking*) durch Übergänge in langlebige Triplett-Zustände zusätzliche Beiträge in der Autokorrelation für kleine Zeitabstände  $\tau$  verursachen, die dementsprechend ausgeglichen werden müssen. *Bleaching* während der Aufnahme, z.B. aufgrund einer zu hohen Anregungsintensität, sorgt für einen abnehmenden Mittelwert des Intensitätssignals, kann aber über eine entsprechende Korrektur des zeitlichen Verlaufs ebenfalls kompensiert werden [107, 108].

### 3.2.2. Single Particle Tracking

Eine direkte Methode, um die Diffusion von Teilchen anhand des MSD auszuwerten, ist die Einzelpartikelverfolgung (**SPT**, *single particle tracking*) (siehe Abb. 3.12) [109]. Diese Technik wurde bereits 1987 verwendet um z.B. die Bewegung von Goldpartikeln im Zytoplasma lebender Zellen zu quantifizieren [110].



**Abb. 3.12: SPT-Prinzip**

Zu sehen ist eine schematische Darstellung für das Messprinzip einer SPT-Messung für normale Diffusion. Beginnend mit der Positionsbestimmung des Partikels in der Probe anhand der aufgenommenen Intensitätsverteilung und einer anschließenden Zuordnung der erkannten Partikel in aufeinanderfolgenden Bildaufnahmen wird die zeitabhängige Position  $x(t)$  bestimmt. Über die Berechnung des zeitlich gemittelten  $\langle \text{MSD}(\tau) \rangle_t = \langle (x(t_i + \tau) - x(t_i))^2 \rangle_t$  für einen Bereich an diskreten Zeitpunkten  $t_i$ , kann die Diffusion des Partikels über unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  bestimmt und mit einem Fit getestet werden.

Die Messmethode besteht grundlegend aus drei Schritten. Zunächst werden aus einer zwei- oder dreidimensionalen Langzeitaufnahme diffundierender Teilchen deren Positionen  $x_i(t)$  in der Probe bestimmt. Die Bestimmung der Position erfolgt in der Regel über einen Fit an die Intensitätsverteilungen der erkannten Teilchen in der Bildaufnahme, z.B. über eine Gaußfunktions-

on, um mit der Lage des Intensitätsmaximums eine Genauigkeit unterhalb der Pixel-Auflösung zu erreichen. Danach wird in einem zweiten Schritt für aufeinanderfolgende Aufnahmen eine mögliche Zuordnung der erkannten Partikel in den einzelnen Bildern bezüglich der zuvor erkannten Partikel anhand ihrer Positionen getestet. So können die Positionen über mehrere Aufnahmen hinweg den individuellen Partikeln zugeordnet werden. Erfolgt keine erfolgreiche Zuordnung wird in der Auswertung eine neue Partikelinstanz erzeugt bzw. endet die Trajektorie eines zuvor erkannten Partikels. So kann für ein einzelnes Teilchen das zeitlich gemittelte MSD  $\langle MSD(\tau) \rangle_t$  für unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  nach Gl. 2.2 direkt aus der rekonstruierten Trajektorien der Teilchenposition bestimmt werden. Bei mehreren Teilchentrajektorien kann zudem auch das Ensemblemittel  $\langle MSD(\tau) \rangle_E$  nach Gl. 2.3 ermittelt werden. Für eine verlässliche Auswertung ist es notwendig, die einzelnen Teilchen auflösen zu können, was in Abhängigkeit der Partikelgrößen und der Auflösung der verwendeten Aufnahmetechnik bzw. des Versuchsaufbaus berücksichtigt werden muss. Eine zu große Pixelgröße in der Probenebene verringert hierbei die Genauigkeit der Positionsbestimmung anhand eines Fits. Zudem ist es für das Tracking erforderlich, dass die Dynamik der Teilchen in Zusammenhang mit der Aufnahmegeschwindigkeit der Bildaufnahme eine eindeutige Zuordnung der individuellen Teilchen zwischen den einzelnen Aufnahmen ermöglicht. Bei zu großen Zeitabständen  $\tau_{\min}$  zwischen den Einzelaufnahmen kann es hier zu falschen Zuordnungen kommen. Darüber hinaus müssen die markierten Teilchen in einer ausreichend verdünnten Konzentration im Bild vorliegen, damit die einzelnen Partikel noch voneinander unterschieden werden können. Eine ausreichend lange Dauer der Aufnahme bzw. der gemessenen Trajektorien ist für die Statistik insbesondere bei großen Zeitabständen  $\tau$  relevant. Aus dem extrahierten  $MSD(\tau)$  der einzelnen Partikel kann nun in einem letzten Schritt die Art des diffusiven Charakters nach Gl. 2.5 oder Gl. 2.7 getestet und der Diffusionskoeffizient bzw. der Anomalieparameter über einen Bereich an Zeitskalen  $\tau$  bestimmt werden. Die Lichtblattmikroskopie ist aufgrund ihrer schnellen Bildaufnahme bei hoher Auflösung und durch die Möglichkeit schonende Langzeitaufnahmen auch in biologischen Proben durchzuführen in besonderem Maße für diese Messtechnik geeignet [83, 111].

### 3.2.3. Differential Dynamic Microscopy

Die sogenannte *differential dynamic microscopy* (DDM) [112–114] gehört zur Klasse der Lichtstreuungsexperimente und ist vergleichbar zu Messungen der dynamischen Lichtstreuung bei kleinen Winkeln. In dynamischen Lichtstreuexperimenten werden ähnlich zu FCS-Experimenten die Fluktuationen des an der Probe gestreuten Anregungslichts gemessen, wobei das Streulicht durch die Streuung an unterschiedlichen Streuzentren in der Probe miteinander interferiert. Eine diffusive Bewegung von Teilchen in Lösung führt so zu einer zeitlich abfallenden Autokorrelation des gemessenen Signals, deren Zeitskala in Zusammenhang mit dem untersuchten Streuvektor eine Abschätzung der Diffusion der untersuchten Partikel erlaubt. Eine erster Einsatz von Laserlichtstreuexperimenten zur Bestimmung der Diffusion von Kolloiden und Proteinen geschah bereits 1967 [115].

In DDM-Messungen wird über Mikroskopaufnahmen die Beweglichkeit markierter Teilchen ebenfalls aus den zeitlichen Fluktuationen der örtlichen Partikelkonzentration ermittelt. Dies geschieht über einen diskreten Wertebereich an Wellenvektoren  $q$ , der sich aus den Pixelabständen und den Abmessungen der aufgenommenen Bilder ergibt. Der Pixelabstand  $x_{\min} = a$  in der Bildebene gibt hierbei den maximalen Wellenvektor  $q_{\max} = \pi/x_{\min}$  vor, die Abmessung einer quadratischen ROI (*Region of Interest*) mit der Kantenlänge  $x_{\max}$  den kleinsten Wellenvektor  $q_{\min} = 2\pi/x_{\max}$ . In einer Messung wird zunächst eine Zeitreihe von Bildern diffundierender Partikel in einer homogenen Lösung aufgenommen. Bei einer Proportionalität der lokalen Bildintensität zur örtlichen Teilchenkonzentration lässt sich so die Dynamik der Teilchen in der Lösung auswerten, indem man die sogenannte Bildstrukturfunktion (*image structure function*,

ISF) im Fourier-Raum betrachtet. Hierzu werden zunächst Differenzbilder

$$\Delta I(x, y, \tau) = I(x, y, t + \tau) - I(x, y, t)$$

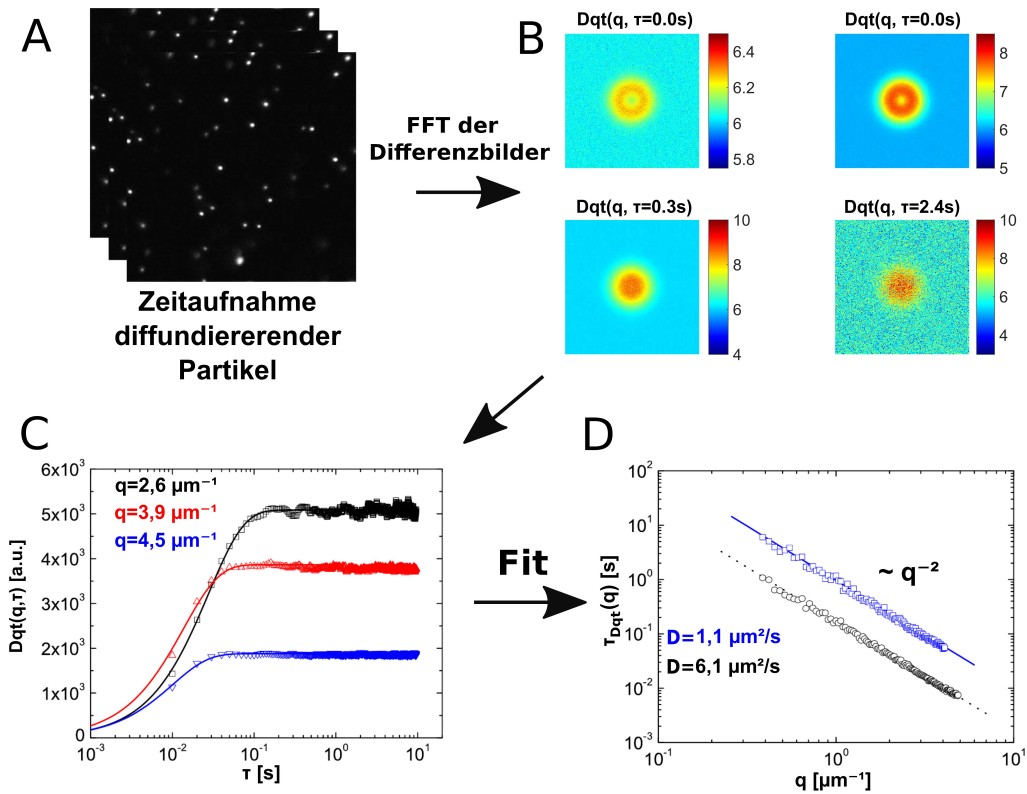
für gewählte Zeitabstände  $\tau$  aus der Zeitreihe gebildet. Diese Differenzbilder werden gemäß

$$\Delta I(q_x, q_y, \tau) = \frac{1}{2\pi} \iint \Delta I(x, y, \tau) e^{-2\pi i(q_x x + q_y y)} dx dy \quad (3.36)$$

in den Wellenvektor-Raum  $q_{x,y}$  fouriertransformiert. Nun wird über alle Realisierungen des gewählten Zeitabstandes  $\tau$  in einer Serienaufnahme gemittelt und die dynamische **Strukturfunktion**

$$Dqt(q_x, q_y, \tau) = \left\langle |\Delta I(q_x, q_y, \tau)|^2 \right\rangle_\tau \quad (3.37)$$

als Erwartungswert des Leistungsspektrums berechnet. Nach einer radialen Mittelung über  $q = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$  aufgrund der Annahme von Isotropie ergibt sich so die eindimensionale Größe  $Dqt(q, \tau)$  für einen gewählten Zeitabstand  $\tau$ . Wiederholt man dies für alle möglichen Zeitabstände  $\tau$  der Bilderzeitreihe, kann man den zeitlichen Verlauf für  $Dqt(q, \tau)$  gegen  $\tau$  betrachten (siehe Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: DDM-Prinzip**

(A) Aus einer Zeitaufnahme von Bildern diffundierender Partikel wird über die Fouriertransformation der Differenzbilder für unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  das Leistungsspektrum  $Dqt(q_x, q_y, \tau)$  (B) berechnet. (C) Nach einer Mittelung der Datensätze über alle Realisierungen des Zeitabstandes  $\tau$  und einer radialen Mittelung werden die erhaltenen Kurven für  $Dqt(q, \tau)$  nach Gl. 3.38 gefittet. (D) Aus den so bestimmten Graphen für  $\tau_{Dqt}(q)$  gegen  $q$  erhält man nach Gl. 3.39 den Diffusionskoeffizienten  $D$  (gezeigt sind  $\tau_{Dqt}$  Werte für zwei unterschiedliche Diffusionskoeffizienten  $D$ ). *Abbildung teilweise übernommen aus [112].*



$Dqt(q; \tau)$  gehorcht bei einer Brownschen Bewegung der Teilchen der Relation [112]:

$$Dqt(q, \tau) = A(q) \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{Dqt}(q)}} \right] + B(q) \quad (3.38)$$

Hierbei steht der Fit-Parameter  $A(q)$  für den Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Teilchenkonzentration, während  $B(q)$  das fluoreszenzsignalunabhängige Leistungsspektrum des Detektorrauschens widerspiegelt. Die Zeitskala  $\tau_{Dqt}(q)$ , die den exponentiellen Anstieg von  $Dqt(q, \tau)$  kennzeichnet, verhält sich für Brownsche Bewegung der Teilchen gemäß

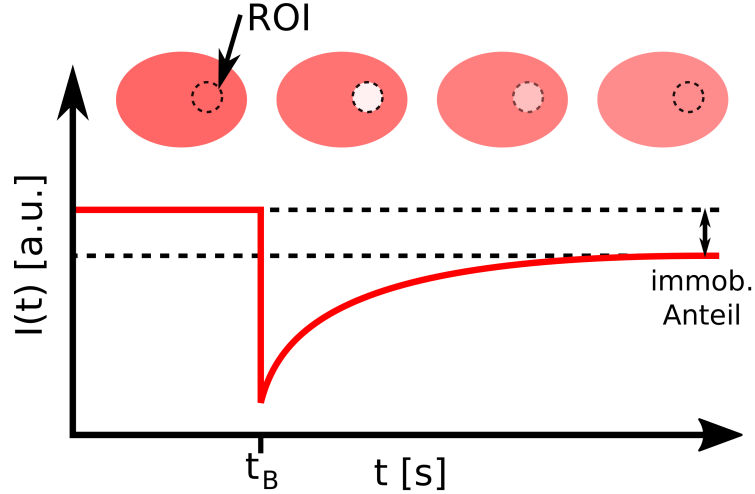
$$\tau_{Dqt}(q) = (D \cdot q^2)^{-1} \quad (3.39)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  der Partikel. Hierdurch lässt sich nun durch die Bestimmung aller  $\tau_{Dqt}(q)$  die Diffusivität der Partikel in Abhängigkeit der Wellenvektoren ermitteln.. Eine erste Realisierung der DDM-Methode wurde 2008 publiziert [112], woraufhin diese in den letzten Jahren mehrfach erfolgreich angewandt und weiterentwickelt wurde. Hierbei wurde die Technik an mehreren Mikroskoptypen (unter anderem in Hellfeld-, Konfokale Fluoreszenz- und Lichtblattmikroskopen [112, 116, 117]) implementiert und auf eine Reihe an unterschiedlichen Proben angewandt, unter diesen typischerweise meist größere Kolloide in wässriger Lösung oder Bakteriensuspensionen [113, 118, 119].

#### 3.2.4. Fluorescence recovery after photobleaching

Ein weiteres Messverfahren zur Quantifizierung von Diffusion und Bindung ist die sogenannte **FRAP**-Technik (*fluorescence recovery after photobleaching*), welche das erste Mal 1976 zur Messung an Farbstoffen in Lösung angewandt wurde [120]. Hierbei wird in einem Bleichexperiment das irreversible Bleichen von Fluorophoren (siehe Abschnitt 3.1.1) wie folgt ausgenutzt: Nachdem die Fluorophore in einem Probenareal bestimmter Größe und Geometrie durch eine lokal begrenzte Anregung hoher Intensität gebleicht wurden, sinkt die dort detektierbare Fluoreszenzintensität. Findet ein Austausch von fluoreszenten Teilchen statt, z.B. durch die Diffusion von ungebleichten Teilchen in die zuvor gebleichte Region, steigt die dort gemessene Fluoreszenzintensität wieder an. Die Zeitskala des Signal-Anstiegs in Abhängigkeit zur Größe und Form der gebleichten Region gibt hierbei Auskunft über die Dynamik bzw. das diffusive Verhalten der Teilchen.

Eine FRAP-Messung ist wie folgt aufgebaut (siehe auch Abb. 3.14): In einer *pre-bleach*-Phase wird zunächst über einen kurzen Zeitraum die Fluoreszenzintensität in der ROI gemessen. Die Aufnahme- und Anregungsparameter werden dabei so gewählt, dass kein merkbares Bleichen der Fluorophore stattfindet. In der nächsten Phase werden nun innerhalb der ROI durch eine erhöhte lokale Laserleistung der Anregung die dort befindlichen Fluorophore so weit wie möglich gebleicht. Dieser Vorgang passiert idealerweise instantan, um einen Teilchenaustausch zwischen der ROI und der Umgebung während des Vorgangs zu vermeiden (Corona-Effekt) [121]. Da dies experimentell jedoch nicht realisierbar ist, wird zumindest versucht, die Bleichphase zeitlich so kurz wie möglich zu halten. In der anschließenden *post-bleach*-Phase wird nun wieder bei stark reduzierter Anregungsleistung die Erholung der Fluoreszenzintensität innerhalb der ROI gemessen, bis sich diese wieder in einem Gleichgewichtszustand befindet. Ein möglicher Unterschied zwischen einem höherem *pre-bleach*-Intensitätsniveau und einem potentiell niedrigerem in der *post-bleach*-Phase erreichtem Plateau der Intensität ist auf einen immobilen Anteil zurückzuführen. Durch Bindung fluoreszenter Teilchen an sehr langsame oder immobile Strukturen außerhalb der ROI können diese nicht zum Austausch der Teilchen innerhalb der ROI beitragen. Zudem kann die Gesamtkonzentration an fluoreszenten Partikeln in der Probe durch irreversibles Bleichen nicht vernachlässigbar herabgesetzt werden.



**Abb. 3.14: FRAP-Prinzip**

In einer *pre-bleach*-Phase wird zunächst die Intensität  $I(t)$  einer ROI in der Probe gemessen. Zum Zeitpunkt  $t_B$  erfolgt das Bleichen der dortigen Fluorophore durch eine stark erhöhte Anregungsleistung in der untersuchten Region. Die Erholung der dadurch zunächst reduzierten Intensität in der ROI wird in der *post-bleach*-Phase gemessen, bis diese sich wieder in einem Gleichgewichtszustand befindet. Durch einen geeigneten Fit an die Erholungskurve kann so der Diffusionskoeffizient oder die Bindungskinetik in der Probe bzw. an der Struktur ermittelt werden.

Die Erholung der Intensität kann bindungs- oder diffusionslimitiert sein. Bei diffusionslimitierter Erholung werden mögliche Bindungsvorgänge der fluoreszenzmarkierten Partikel vernachlässigt und das erwartete Verhalten der Erholung der Fluoreszenzintensität  $F(t)$  lässt sich je nach verwendeter Geometrie der ROI theoretisch berechnen [122]. Für eine kreisförmige ROI ist die Fluoreszenzerholung beschrieben als:

$$I(t) = A + Be^{-z} \{I_0(z) + I_1(z)\} \quad , \text{ mit } z = \frac{R^2}{2Dt} \quad (3.40)$$

mit den Fit-Parametern  $A$  und  $B$  und den modifizierten Besselfunktionen  $I_{0,1}(z)$  nullter und erster Ordnung. Dies gilt für eine kreisrunde ROI mit dem Radius  $R$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D$ . Durch eine geeignete Fit-Prozedur lässt sich so der Diffusionskoeffizient nach Gl. 3.40 ermitteln. Mit der FRAP-Methode kann zudem auch Bindungskinetik untersucht werden. Für eine bindungslimitierte Erholung der Fluoreszenz, z.B. durch Proteinbindung an eine Zellorganelle, wird die betroffene, immobile Struktur über die Wahl einer passenden ROI gebleicht. Unter Annahme von Anbindung und Dissoziation der markierten Proteine aus der Umgebung an die Struktur und des Teilchenanzahlerhalts im System ergibt sich eine Differentialgleichung mit der allgemeinen Lösung

$$I(t) = A + Be^{-\frac{t}{\tau_B}} \quad (3.41)$$

und einer typischen Zeitskala  $\tau_B$  der Bindungsvorgänge [123]. Aus der Zeitskala der Erholung lassen sich so z.B. die Bindungsraten der Anbindung und Dissoziation abschätzen [124].

Neben der klassischen FRAP-Methode, wie oben beschrieben, sind auch vergleichbare andere Implementierungen von Bleichexperimenten möglich. In einem **FLIP**-Experiment [125] (*fluorescence loss in photobleaching*) wird der Abfall der Fluoreszenz außerhalb der gebleichten ROI innerhalb eines kontinuierlichen Bleichvorgangs zeitlich und räumlich betrachtet, um Aussagen über die Bewegung der Moleküle zu treffen.

Bei beiden Bleichmethoden ist darauf zu achten, dass durch das Photobleichen in lebenden

Proben auch phototoxische Effekte auftreten können, die das Verhalten von Zellen verändern können. Da der Bleichvorgang in einer lokal möglichst spezifischen ROI geschehen sollte, wird für FRAP-Experimente normalerweise ein CLSM verwendet. Dies kann jedoch aufgrund der zeitlichen Dauer einer einzelnen Aufnahme durch die Abrasterung der Probe zu Problemen bei einer schnellen Erholung des Signals führen, wenn die zeitliche Erholung in der *post-bleach*-Phase nicht hinreichend genau abgetastet werden kann.

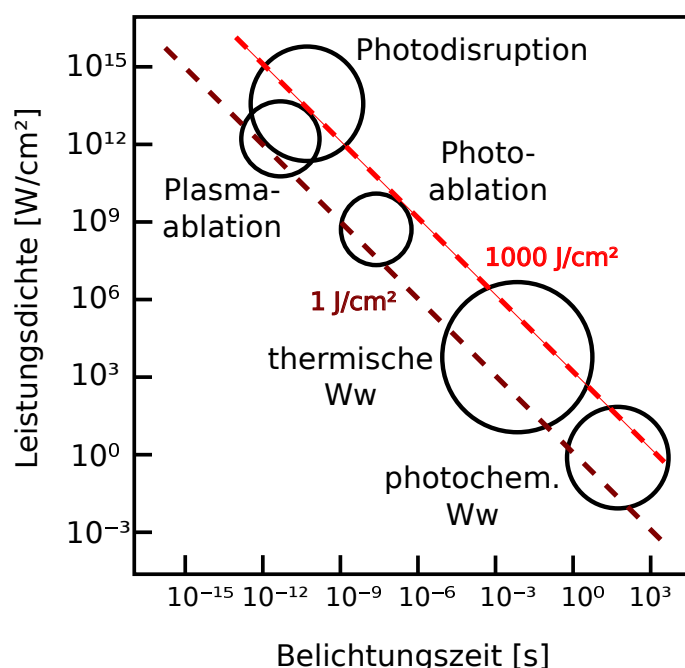
Ein Bestandteil dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Mikroskopaufbaus, welcher eine hohe Bild-Aufnahmerate bei konfokaler Auflösung über eine Spinning-Disk-Einheit mit der Möglichkeit verbindet, Bleichexperimente über einen separat in die Probe eingebrachten Laserfokus zu ermöglichen (siehe Unterkap. 9.2). Dies erlaubt eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung der Bildaufnahmen in Kombination mit Bleichexperimenten in einer ROI beliebiger Größe und Abmessung.

### 3.3. Laser-Ablation

Neben den Methoden der Zellmanipulation durch chemische oder genetische Veränderungen an der Probe ist die gezielte, minimalinvasive Manipulation von Zellen bzw. von Strukturen in der Zelle durch fokussierte Strahlung seit langem ein wichtiges Werkzeug biologischer Untersuchungen. Die Laser-Ablation ist hierbei eine Technik zum gezielten Abtragen bzw. Schneiden von Materialien und Strukturen. Anders als bei einer mechanischen Manipulation können hierbei einzelne intrazelluläre Organellen in der lebenden Probe adressiert werden ohne die Zellmembran zu verletzen, was ansonsten typischerweise zum Tod der Zelle führen würde. Die erste erfolgreiche Durchführung solcher Experimente wurde bereits 1912 von Sergej Tschachotin in Form der „mikroskopischen Strahlenstichmethode“ mithilfe fokussierter Strahlen von Magnesiumfunken realisiert [126]. Zahlreiche Weiterentwicklungen, insbesondere nach der Kommerzialisierung von Laserapparaturen in den 1960ern, führten zu einer entsprechenden Verbesserung der Gerätespezifikationen und eröffneten neue Fragestellungen (siehe [127] für eine Übersicht). Mit der Möglichkeit der gezielten Sichtbarmachung spezifischer Zellorganellen durch Fluoreszenzmarkierungen wurde zudem die Genauigkeit der Probenmanipulation sowie die Untersuchung der daraus resultierenden Effekte dramatisch verbessert [128]. In der Zellbiologie wird dies z.B. in Kulturzellen oder einzelnen Zellen in einem Embryo verwendet, um an bestimmten Strukturen innerhalb der Zelle Veränderungen herbeizuführen ohne die Gesamtintegrität der Zelle zu sehr zu beeinträchtigen [127–133]. Daneben ist es auch möglich z.B. in Embryonen und adulten Lebewesen einzelne Zellen abzutöten, um die Effekte auf den Organismus bzw. den weiteren Verlauf der Embryogenese zu untersuchen [133, 134].

Der Effekt basiert auf der Energieeinbringung durch einen lokal begrenzten Laserfokus mit einer hohen Leistungsdichte und kurzer Pulsdauer. Dies kann bei geeignet hohen Leistungen zur Ionisierung und Ausbildung eines Plasmas führen, was zur Auflösung der Molekülbindungen in den bestrahlten Strukturen führt. Welcher Effekt bei der Bestrahlung entsteht und zu den Strukturänderungen führt, hängt von der Leistungsdichte in der Probenstelle, der Bestrahlungs- bzw. Pulsdauer und dem Absorptionskoeffizienten des Mediums ab (siehe Abb. 3.15). Bei geringer Leistungsdichte und langer Beleuchtung treten zunächst photochemische Wechselwirkungen auf. Bei höherer Leistung kann Gewebe durch thermische Wechselwirkungen z.B. über Schmelzprozesse, Denaturierung, Verkohlung oder Verdampfen verändert werden. Hohe Leistungsdichten mit Pulsdauern im Bereich von 10 – 100ns können Photoablation verursachen, bei der die Energie der absorbierten Photonen zu einer Dissoziation von Molekülen führt, wenn deren Bindungsenergie überstiegen wird. Hierbei wird auch eine gewisse Menge an thermischem Stress an die Umgebung abgegeben. Die plasmainduzierte Ablation kann bei hohen Energiedichten und der Verwendung von Pulsdauern im Bereich von 100fs – 500ps erreicht werden. Die

lokal sehr begrenzte Auflösung von Molekülbindungen erfolgt hierbei ohne merkbare Abgabe thermischer oder mechanischer Beschädigungen an der unmittelbaren Umgebung (jedoch kann z.B. gestreutes UV-Licht weiterhin zu Schäden in biologischen Proben führen). Bei zu hohen Leistungsdichten kann es zur sogenannten Photodisruption kommen. Da das entstehende Plasma einen erhöhten Absorptionskoeffizienten aufweist, kann dieses z.B. bei zu langen Pulsdauern dazu führen, dass das Plasma rasch an Größe gewinnt (*plasma shielding* [135]) und durch die Plasmaexpansion eine akustische Schockwelle durch das Entstehen einer Kavitationsblase ausgelöst wird. Dies kann selbst bei einem beugungsbegrenztem Anregungsfokus zu mechanischen Schäden auf einer Längenskala von 1–10µm in der Probe führen. Neuere Studien haben gezeigt, dass auch bei der Verwendung von ns-Pulsen eine Genauigkeit von 250 – 300nm erreicht werden kann, was die Entstehung eines Plasmas ohne Photodisruption auch bei diesen Pulsdauern bestätigt [127].



**Abb. 3.15: Abschätzung der Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Laserstrahlung**  
In Abhängigkeit von der Leistungsdichte in der Probe und der Bestrahlungs- bzw. Pulsdauer können unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Gewebe auftreten. Neben den photochemischen und thermischen Wechselwirkungen sind hier insbesondere die Photo- und Plasmaablation für gezielte Probenmanipulationen von Interesse. Während bei der Photoablation Wärme in die Umgebung der Probe abgegeben wird, ist dies bei der Plasmaablation nochmals stark reduziert. Bei zu hoher Leistungsdichte kann es zur Photodisruption kommen, bei der das schnell anwachsende Plasma zur Entstehung einer akustischen Schockwelle in der Probe führt, was zu einer großflächigen Zerstörung von Strukturen in der Probe führen kann.  
Abbildung nach [129]

Ein Bestandteil dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Mikroskopaufbaus, der die zielgerichtete Durchführung von Ablationsexperimenten unterhalb der µm-Skala an Kulturzellen und Embryonen des Fadenwurms *C. elegans* erlaubt (siehe Unterkap. 9.3). Dies erfolgt über die Einbringung eines gepulsten UV-Lasers und eines Galvospiegelpaares mit einer Softwareumgebung, die eine Abfolge an Fokuspositionen innerhalb der Probe ermöglicht. Die Bildaufnahme während der Ablationsexperimente wird durch eine Spinning-Disk-Einheit am Mikroskopstativ innerhalb eines zusätzlichen Anregungs- und Detektionswegs ermöglicht.

---

---

---

Teil II.

## Weiterentwicklung und Einsatz eines Lichtblattmikroskops

## 4. SPIM-Aufbau

*Dieses Kapitel beschreibt die Weiterentwicklung eines Lichtblattfluoreszenzmikroskops (im Nachfolgenden **SPIM** genannt). Ein ursprünglicher Prototyp des Aufbaus wurde bereits 2012 durch den damaligen Diplomstudenten Herrn Michael Schaub im Rahmen seiner Diplomarbeit am Lehrstuhl realisiert [136]. Daran anschließend wurde der Aufbau durch den Autor dieser Arbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit fertiggestellt und erweitert [78]. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau wiederum weiterentwickelt und mit dem Fokus auf schnelle, schonende, dreidimensionale Langzeitmessungen der frühen Embryogenese von Wurmembryonen mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung optimiert und eingesetzt [16, 17]. Das System wurde darüber hinaus um die Einsatzmöglichkeit quantitativer Diffusionsmessungen erweitert [103]. Zudem wurde ein weiterer an die Apparatur anschließender Versuchsaufbau in Form eines Lichtblattmikroskops veränderter Geometrie entwickelt, um neue Möglichkeit der Probenpräparation und ergänzende Techniken der Probendetektion zu ermöglichen. Soweit nicht anders vermerkt wurden Weiterentwicklung, Aufbau und Kalibration, Programmierung der Kontrollsoftware sowie Messungen und Datenevaluation zur Aufbaucharakterisierung durch den Autor dieser Arbeit durchgeführt. Weitere Details zu Messverfahren, Datenverarbeitung und -evaluierung finden sich applikationsspezifisch in den Kap. 5, 6 und 7.*

### Weiterentwicklungen zum vorherigem Aufbau

Details zu ursprünglichen Versionen dieses Aufbaus sowie Entwicklung von einem frühen Prototypen an finden sich in [78, 136]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Weiterentwicklungen am Aufbau vorgenommen:

- Konzeptionierung und Einbau einer beheizbaren Probenkammer zur Temperaturkontrolle während einer Langzeitaufnahme
- Einbau eines akustooptischen Filters (**AOTF**, *acousto-optical tunable filter*) für schnelle Shutter-Aufgaben und zur Intensitätsmodulierung
- Einbau eines zweiten Anregungslasers und Anpassung des Systems zur Aufnahme von Mehrkanalmessungen
- Implementierung eines geschriebenen Lichtblatts (**DSLM**) über Einbau eines galvanometrischen Spiegelpaares zur homogenen Ausleuchtung der Probe und zukünftigen Implementierung einer konfokalen Schlitzauslesung der Kamera

Die notwendige Ansteuerung der neuen Komponenten erforderte und ermöglichte zudem die

- Anpassung und Optimierung der Steuersoftware und des Messvorgangs sowie die Synchronisierung der beteiligten Komponenten über ein Multifunktionsdatenerfassungsgerät

Um neue Arten der Probenpräparation und Bildaufnahme zu erlauben, wurde der vorgestellte Aufbau zudem um einen zweiten Abschnitt erweitert. Dieser wurde vom Verfasser dieser Arbeit konzipiert, aufgebaut und für erste Messungen verwendet. Die weitere Charakterisierung dieses Aufbaus sowie Messungen nach der DDM-Methode (siehe Kap. 3.2.3) sind Bestandteil einer Bachelor-Arbeit von Herrn Lukas Weihmayr [137], welcher vom Verfasser dieser Arbeit betreut wurde. Dieser Teil des Versuchsaufbaus wurde des Weiteren bereits im Rahmen eines Fortgeschrittenen-Praktikums von Studenten der Universität Bayreuth genutzt.

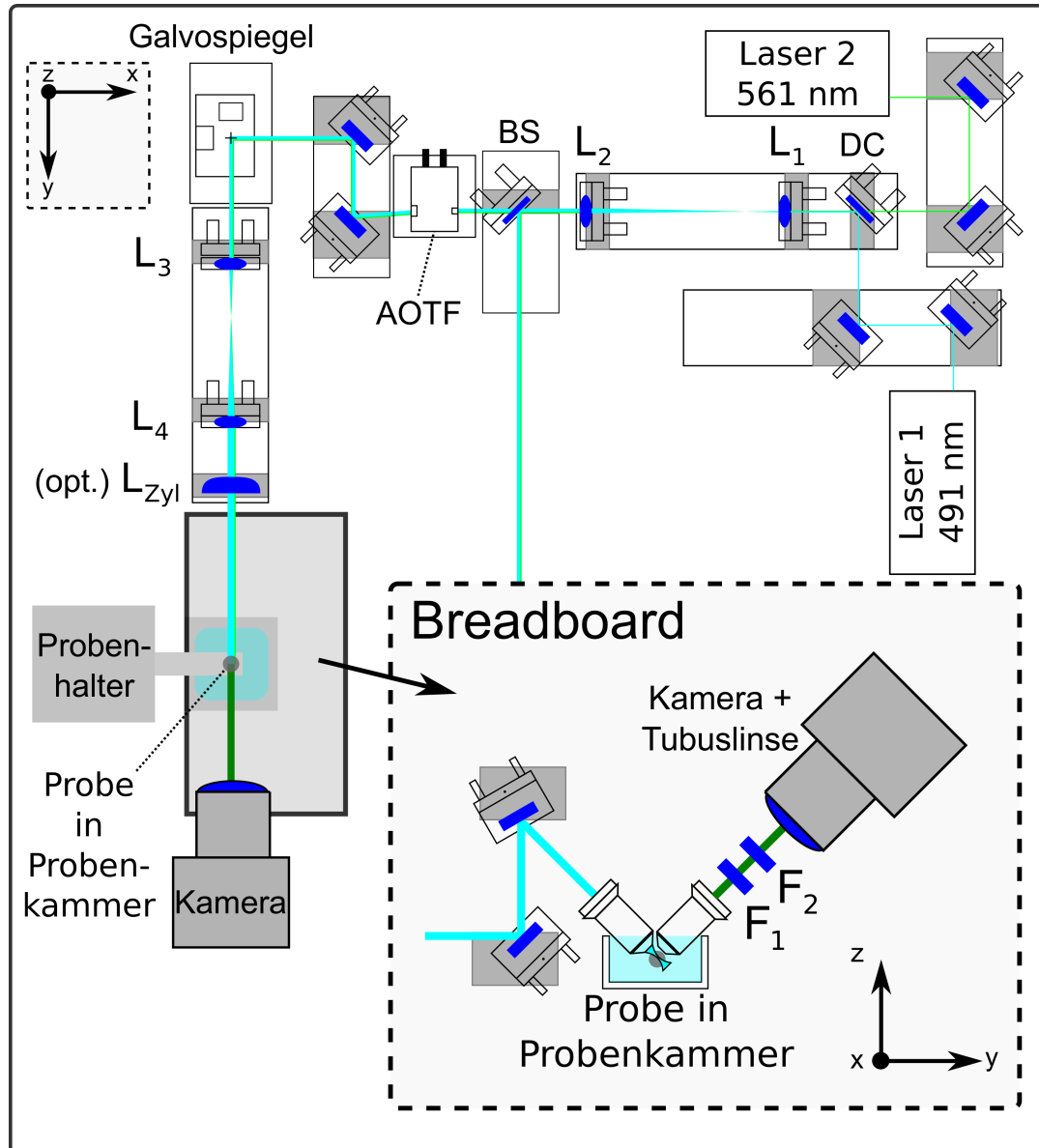


### 4.1. Hardware-Setup

Eine Skizze des Aufbaus findet sich in Abb. 4.1. Der Aufbau befindet sich auf einem optischen Tisch der Firma CVI Melles Griot (Albuquerque, USA). Die verwendete Tischplatte (*OTTR-203-1219-1829-M6*) ist mit M6-Gewinden in einem 25mm Raster versehen. Die Tischplatte steht auf vier passiven Schwingungsisolatoren (*07 OTI 055*, Melles Griot) zur Dämpfung von Erschütterungen. Der Großteil des Aufbaus basiert auf einem Schienen-Reiter-System des Herstellers OWIS GmbH (Staufen, Deutschland). Im *SYS-65*-System der Firma Owis verfügen die erhältlichen optischen Halterungen über eine optische Achse in 65mm Höhe über der Tischfläche. An mehreren Stellen des Aufbaus wurden auch Produkte anderer Hersteller, vorwiegend optomechanische Komponenten der Firma Thorlabs Inc (Newton, USA), verbaut und entsprechende Adapterplatten eigenständig entworfen und in den Mechanikwerkstätten (NW1 und NW2) der Universität in Auftrag gegeben. Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Bauteile sowie Bilder des Aufbaus finden sich im Anhang in Tab. 10 und Abb. D.1.

#### Anregungsstrahlengang und Justage

Zur Fluoreszenzanregung stehen zwei DPSS-Laser (*diode-pumped solid-state laser*), welche im CW-Modus (*continuous wave*) betrieben werden, zur Verfügung. Der *Cobolt Calypso*, sowie der *Cobolt Jive* der Firma Cobolt AB (Solna, Schweden) verfügen jeweils über eine Wellenlänge von 491nm und 561nm und sind somit zur Anregung gängiger Fluorophore wie z.B. Alexa488, eGFP und mCherry geeignet (siehe Abb. 3.2). Die Ausgangsleistung beider Laser beträgt jeweils 0,5 – 60mW mit einem Ausgangsdurchmesser des Strahls von jeweils  $\sigma_{\text{Laser}} = (700 \pm 50)\mu\text{m}$ . Beide Laserlinien werden über je zwei Spiegel (*BB1-E02*, Thorlabs) und einen Dichroiten (*DMLP505 Longpass Dichroic Mirror*, Thorlabs) auf eine gemeinsame optische Achse gebracht. Um einen möglichst genauen Überlapp der beiden Strahlachsen bzw. der später entstehenden Lichtblätter zu garantieren, wird dieser zunächst an zwei unterschiedlichen Positionen entlang der Strahlachse über ein *Pinhole* (*IB-D54-0-37*, Owis) justiert. Anschließend wird dieser Prozess in einem zweitem Durchlauf mittels der Verwendung eines *Beam-Profilers* (*BP209-VIS Dual Scanning Slit Beam Profiler*, Thorlabs) an zwei Stellen entlang des Strahlenganges wiederholt. Beide Strahlen werden danach durch die Verwendung eines Teleskopstrahlenganges bestehend aus zwei Sammellinsen (*AC254-xxx-A*, Thorlabs, mit unterschiedlichen Brennweiten  $f$ ) aufgeweitet und mittels eines *Shearing Interferometers* (*SI050*, Thorlabs) bezüglich der Kollimation der Strahlen nach dem Teleskopaufbau überprüft. Der Aufweitungsfaktor  $M_1$  ergibt sich aus dem Brennweitenverhältnis der Linsen  $f_{1,2}$  zu  $M_1 = \frac{f_2}{f_1}$  und kann, je nach gewünschter Lichtblattstärke, durch Austausch der verwendeten Linsen variiert werden. Eine Übersicht verwendeter Linsenkombinationen und Strahldurchmesser findet sich im Anhang dieser Arbeit in Tab. 11. Nach dem Teleskopaufbau passieren die Strahlen den AOTF (*AOTFnc-400.650*, AA Opto-Electronic, Orsay, Frankreich), der durch die Erzeugung einer Schallwelle in einem Kristall ein optisches Gitter erzeugt. Durch die Beugung am optischen Gitter kann so eine abgelenkte Mode des Strahls erzeugt werden, die in ihrer Intensität sehr schnell modulierbar (Ansprechzeit  $< 4\mu\text{s}$ ) ist. Im weiteren Verlauf des Strahlengangs wird die so in ihrer Intensität modulierbare erste Mode der Strahlen über zwei Spiegel auf ein galvanometrisches Spiegelpaar (*6210H mit 3mm XY Mirror Set Protected Aluminum Coating*, Cambridge Technology, Bedford, USA) gelenkt, welches über Anlegen einer Spannung in seinen Winkelpositionen verstellbar ist und zur gezielten Ablenkung des Strahls während der Messung in der Probe verwendet werden kann. Zur exakten Positionierung des Galvospiegelhalters ist dieser auf zwei manuellen Linearverschiebetischen montiert. Um die Auslenkung nach dem Galvospiegelpaar in eine korrekte Verschiebung des Strahls in der Probe zu übersetzen, ist es notwendig, die Abstände der zwei nachfolgenden Sammellinsen (*AC254-xxx-A*, Thorlabs) und des Anregungsobjektivs im telezentrischen Prinzip, d.h. in den Brennweitenabständen der Optiken, anzuordnen (siehe Abb. 3.7).



**Abb. 4.1: Skizze des SPIM-Aufbaus**

Gezeigt ist eine Skizze des SPIM-Aufbaus. Die Laser 1 und 2 werden über Spiegel und einen Dichroiten (DC) auf eine gemeinsame optische Achse einjustiert. Über einen Teleskopaufbau aus den Linsen  $L_1$  und  $L_2$  wird der Strahl aufgeweitet und kollimiert. Ein Strahlteiler (BS) koppelt bei Bedarf einen Teil der Intensität der Strahlen zu einem anderen Teil des Aufbaus aus (hier verdeckt). Die transmittierten Strahlen treffen auf den AOTF. Die erste Mode der gebeugten Strahlen wird über zwei weitere Spiegel auf ein Galvospiegelpaar gelenkt. Über zwei weitere Linsen  $L_{3,4}$  erfolgt eine weitere Vergrößerung des Strahls. Die Linsen sind zum Galvospiegelpaar und dem Anregungsobjektiv entsprechend des telezentrischen Prinzips in ihren Brennweitenabständen zueinander positioniert. Für die Verwendung eines statischen Lichtblatts kann optional eine Zylinderlinse  $L_{Zyl}$  eingebaut werden. Der restliche Teil des Aufbaus ist auf einem vertikal stehenden Breadboard aufgebaut (siehe eingerahmte Box rechts unten in der Abbildung). Hier werden die Strahlen über zwei Spiegel auf das Anregungsobjektiv gelenkt. Die Probe befindet sich in der flüssigkeitsgefüllten Probenkammer. Über ein zweites Objektiv wird so die angeregte Fluoreszenz in der Probe detektiert und über zwei Filter  $F_{1,2}$  die Anregungswellenlängen geblockt. Eine Tubuslinse bildet das Fluoreszenzbild auf den Kamerasensor ab.

Zunächst wird der Strahlengang hierfür über die beiden Spiegel vor dem Galvospiegelpaar auf die optische Achse der nachfolgenden Komponenten ausgerichtet. Nun wird ein erneuter Teleskopaufbau aus zwei Sammellinsen der Brennweiten  $f_{3,4}$  derart eingebaut, dass der Abstand der ersten Linse zum Mittelpunkt des Galvospiegelsystems der Brennweite  $f_3$  entspricht. Erneut wird hierdurch eine Vergrößerung  $M_2 = \frac{f_4}{f_3}$  erreicht, was zu einer Gesamtvergrößerung  $M = \frac{f_2 f_4}{f_1 f_3}$  führt. Um einen entstehenden Höhenunterschied der Strahlachse nach dem Galvospiegelpaar auszugleichen, wurden entsprechende Abstandshalter gefertigt und zwischen Schienen und optischem Tisch positioniert. Der Strahl wird über den Sammellinsenabstand kollimiert und über zwei weitere Spiegel, die auf einem senkrecht errichtetem *Breadboard*-System (*MB3030/M* mit *VB01/M*-Halterungen, Thorlabs) angebracht sind, vertikal umgelenkt. Der Strahl trifft auf das Anregungsobjektiv *HCX APO L 10x/0.30 W U-V-I* (Arbeitsabstand 3,6mm) der Firma Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland), dessen hintere Fokusebene (**BFP**, *back focal plane*) in einem Abstand gemäß  $f_4$  zur vorherigen Sammellinse positioniert ist. Durch diese Anordnung der Optiken in den jeweiligen Brennweitenabständen ist das Prinzip einer telezentrischen Ausleuchtung erfüllt. Aufgrund von Abbildungsfehlern sphärischer Linsen bei einem schiefwinkligen Strahlungseinfall ist deren Fokusebene leicht verkrümmt. Dies kann durch die Verwendung einer sogenannten telezentrischen Scan-Linse, die eine ebene Fokusfläche orthogonal zur Strahlachse des Systems garantiert, umgangen werden. Aufgrund der Beschränkung auf nur geringe Winkelauslenkungen und demnach nur geringer zu erwartender Aberrationen erwies sich in diesem Aufbau die Verwendung von klassischen Sammellinsen als ausreichend. Die Erzeugung eines dynamisch gescannten Lichtblatts erfolgt durch eine schnelle iterative Winkelbewegung eines der beiden Galvospiegel, während der andere Spiegel zur Nachjustage der Lichtblatthöhe in der Probe verwendet werden kann. Zur Erzeugung eines statischen Lichtblatts kann zusätzlich eine Zylinderlinse (*LJ1277L1-A*, Thorlabs) in den Strahlengang zwischen der letzten Sammellinse und dem Anregungsobjektiv eingebracht werden (siehe Abb. 3.7). Diese muss in einem Abstand gemäß ihrer Brennweite  $f_{Zyl} = 250\text{mm}$  zur BFP des Anregungsobjektivs positioniert werden und fokussiert den Strahl nur in einer Raumdimension, was zu einem Teleskopaufbau mit dem Anregungsobjektiv und einer endlichen Breite des Lichtblatts in dieser Dimension führt. Durch die Fokussierung des Strahls durch das Objektiv in der anderen Raumdimension wird so eine schmale Taille des geformten Lichtblatts erreicht. Die Verwendung eines *Breadboards* zur Montage der Optiken und die 45°-Ausrichtung der Objektive zur Ebene des optischen Tisches ist vergleichbar zu [74, 101] und erleichtert die Probenpräparation insbesondere bei Messungen an Wurmembryonen [16, 17].

### Probenkammer, Proben-Positionierung und Auflichtquelle

Aufgrund der verwendeten Proben müssen diese während einer Langzeitmessung in einer wässrigen Umgebung bzw. einer Pufferlösung gehalten werden. Die hierfür nötige Probenkammer besteht aus einer durchsichtigen Kunststoffwand mit zugehörigem Deckel, in dem Aussparungen für die notwendigen Immersionsobjektive vorhanden sind. Der Boden der Probenkammer besteht aus Aluminium und einem auf der Unterseite angebrachten Peltier-Element *MCTE1-12715L-S* (Farnell, Aschheim, Deutschland) zur Aufheizung der Bodenplatte. Die Spannungsversorgung des Peltierelements ist in einem Regelkreis mit einem PT100 Widerstandsthermometer verbunden, welches in die flüssigkeitsgefüllte Probenkammer eingetaucht wird. Über ein Bedienoberfläche kann eine Soll-Temperatur der Probenkammer-Flüssigkeit eingestellt und die momentane Temperatur angezeigt werden. Über eine *Swiss Boy 100*-Hebebühne der Firma Rudolf Grauer AG (Degersheim, Schweiz) wird die Variation der Höhenposition der gesamte Probenkammer zur Probenmontage ermöglicht. Der Probenpositionierer besteht zum einen aus zwei horizontal montierten, motorisierten Linearverschiebetischen *T-LS28M-KT03* der Firma Zaber Technologies Inc (Vancouver, Kanada), mit einer minimalen Schrittweite von 99nm und einem maximalen

Verschieberegion von 28mm. Eine Grob-Positionierung der Höhenposition erfolgt manuell über einen zusätzlichen Hebetisch der Firma Linos GmbH (Göttingen, Deutschland) mit einem Verstellbereich von 10mm. Zur exakten Probenverschiebung relativ zum Lichtblatt bzw. der Fokusebene des Detektionsobjektivs während einer Messung wird ein angepasster Objektiv-Scanner *P-721 PIFOC* der Firma Physik Instrumente (Karlsruhe, Deutschland) mit einem Verschieberegion von 100µm und einer Wiederholgenauigkeit von 5nm verwendet. Die Probe selbst ist auf einem Eigenbauprobenhalter aus schwarz eloxiertem Aluminium angebracht. Die sich auf einem Deckgläschen befindliche Probe wird mittels Vakuumfett reversibel auf diesen aufgeklebt. Für unterschiedliche Proben steht eine Auswahl an entwickelten Probenhaltern zur Verfügung, die an dem Objektiv-Scanner angebracht werden können (siehe [78]). Eine LED-Lampe mit frei verstellbarem Teleskoparm (*JANSJÖ Arbeitsleuchte*, INGKA Holding B.V., Leiden, Niederlande) wird für die Erstellung von Auflichtaufnahmen der Probe und zur schnellen Probenfindung verwendet.

### **Detektionsstrahlengang und Kamerasensor**

Die Detektion der angeregten Fluoreszenz erfolgt über ein weiteres, zum Anregungsobjektiv senkrecht montiertes Objektiv *HCX APO L 40x/0.80 W U-V-I* (Arbeitsabstand 3,3mm) (Leica Microsystems). Die exakte Position des Objektivs kann entlang und orthogonal zur optischen Achse bzw. parallel zur Breadboardfläche über zwei Linearverschiebetische einjustiert werden. Das detektierte Signal passiert ein Filterrad (*FW2A Filter Wheel Station*, Thorlabs) auf dem zwei hintereinander positionierte Filterstellungen zur Signalfilterung vorhanden sind. Hierfür stehen für die Detektion von GFP ein Bandpassfilter mit einer Transmission im Bereich von 508 – 554nm (*531/46 nm BrightLine® single-band bandpass*, Semrock, Rochester, USA) sowie ein Kanten-Filter (*488 nm EdgeBasic*, Semrock) mit einer Transmission im Wellenlängenbereich von 505–900nm zur Verfügung. Hinter diesen ersten Filtern kann ein Notch-Filter (*SEM-NF03-561E-25*, Semrock) zur Blockierung des Anregungslichts bei 561nm eingebracht werden. Bei gleichzeitiger Verwendung des Kanten-Filters und des Notch-Filters können so Mehrkanal-Aufnahmen ohne Filterwechsel zwischen den Aufnahmen getätigt werden. Der Filterwechsel ist manuell über Rotation der beiden Filterradstellungen auf 2 · 6 unterschiedliche Filterpositionen möglich. Das so gefilterte Signal wird nach dem Detektionsobjektiv über eine Sammellinse (*AC508-200-A*, Thorlabs) auf den Kamerasensor der verwendeten sCMOS-Kamera (*scientific complementary metal-oxide-semiconductor*) *ORCA-Flash 4.0* der Firma Hamamatsu Photonics, K.K. (Hamamatsu, Japan) abgebildet. Der Sensor besteht aus 2048 × 2048 Pixeln mit einem Pixelabstand von 6,5µm bei einer Quanteneffizienz von 65 – 70% im Bereich von 500 – 600nm. Bei voller Bildgröße und durch die Verwendung einer *FireBird Camera Link card* sind Bildaufnahmezeiten von bis zu 100fps möglich, wobei bei einer Reduzierung der ausgelesenen Zeilen auf dem Sensor bis zu 25655fps erreicht werden können. Die Kamera ist an einem Eigenbaukamerahalter befestigt, der zwei um 90° verdrehte Kamerapositionen erlaubt. So kann die Ausleserichtung des Sensors entlang oder senkrecht zur Strahlrichtung der Anregung durchgeführt werden. Dies ist von Bedeutung wenn man entweder einen schmalen Bereich in der Lichtblatttaille bei hoher Bildaufnahmezeit messen oder die zeilenweise Auslesung der Kamera mit dem Schreiben eines Lichtblatts synchronisieren will (*Lightsheet-Readout-Mode* [73]). Die kameraseitige Implementierung der zweiten Bildaufnahmetechnik wurde auf dem Sensor nachträglich über ein Firmware-Upgrade ermöglicht. Zur Abschirmung von Streulicht ist der Detektionspfad zusätzlich mit einem Rohr aus schwarzer Pappe versehen.

## **4.2. Aufbauansteuerung, Kontroll- und Evaluationssoftware**

### **Ansteuerungskomponenten**

Zur Ansteuerung des Messaufbaus wird ein *CELSIUS W520* der Firma Fujitsu K.K. (Tokio,

Japan) mit 16 GB Arbeitsspeicher, einem *Intel® Xeon® Processor E3-1220V2 @ 3.10 GHz* -Prozessor und einem *Windows 7 Professional 64-bit* -Betriebssystem verwendet. Die Kommunikation zu den im Messaufbau verbauten Komponenten geschieht zum einen über serielle Kommunikation mittels USB- oder RS-232-Anschlüssen. Weitere analoge und digitale Eingangs- und Ausgangssignale werden über das Multifunktionsdatenerfassungsmodul *NI PCIe-6353* und zwei *SCB-68A Connector Blocks* der Firma National Instruments Corporation (Austin, USA) verarbeitet. Die serielle Kommunikation, Interaktion mit dem Datenerfassungsmodul, sowie die allgemeine Ansteuerungsarchitektur und Benutzeroberfläche wurden mit der Softwareumgebung *LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench)* von National Instruments durch den Autor dieser Arbeit erstellt (*LabVIEW 2012 Version 12.0*, 64bit). Die Kamera selbst kann ebenfalls über eine existierende, *LabVIEW*-basierte Software angesteuert werden. Hierbei hat es sich jedoch als stabiler und schneller erwiesen, diese über die Hamamatsu-eigene Software *HoKaWo* (V2.10) anzusteuern und die Synchronisierung über Triggersignale sicherzustellen. Die über die durch die Software angesteuerten Komponenten sind wie folgt:

- Anregungslaser: *Cobolt Calypso / Jive* (seriell. Kommun.)
- AOTF: *AOTFnC-400.650* (Analoge Ausgangssignale + TTL-Signal Blanking über *NI PCIe-6353*)
- Galvanometer-Spiegel-Paar (Analoge Ausgangssignale + TTL-Signal Blanking über *NI PCIe-6353*)
- Probenpositionierer x/y: *T-LS28M-KT03* (seriell. Kommun.)
- Probenpositionierer z: *P-721 PIFO*C (seriell. Kommun.)
- Kamera: *ORCA-Flash 4.0* (TTL-Triggersignale über *NI PCIe-6353*)

### Messprogramm

Das Messprogramm besteht aus einer graphischen Oberfläche zur Eingabe der Aufnahmeparameter und verfügt über unterschiedliche Modi zum Test dieser Parameter während einer Live-Aufnahme. Eine Abbildung des Programms sowie eine ausführliche Behandlung der einzelnen Parameter findet sich im Anhang in Abschnitt B. Die möglichen Eingabeparameter setzen sich wie folgt zusammen:

- Laserleistung der beiden Anregungslaser
- Blanking und Modulation des AOTF zur unabhängigen Laserleistungsmodulation der beiden Anregungswellenlängen
- PIFOC-Position bzw. Verfahrensbereich, Schrittweite und Schrittzahl für eine Stack-Aufnahme aus zweidimensionalen Bildern mit festem Abstand zwischen den Ebenen.
- Parameter zur Langzeitaufnahme von 3D-Stacks (Stackanzahl, Zeitabstand, Wahl zwischen Ein- oder Mehrkanalmessungen)
- Positions- bzw. Winkelkontrolle der Galvospiegel sowie eine Oberfläche zur Erstellung einer Spannungskurve zur Kontrolle der Lichtblatterzeugung über den DSLM-Ansatz

Ein separates Messprogramm aus [78] zur Probenfindung beinhaltet zusätzlich:

- Positionsansteuerung der x/y-Probenpositionierung mit der Möglichkeit Positionen zu speichern

Vor dem Beginn einer Langzeitmessung muss innerhalb der Bildaufnahme-Software ein *Live-Stream* bekannter Bildanzahl eingestellt und die Kamera in einem externen *Edge-Trigger*-Modus geschaltet werden. Nach Beginn der Aufnahme in der *HoKaWo*-Software kann die Messung über die *LabVIEW*-Software gestartet werden. Nach Erreichen der Probenposition wartet das Messprogramm hierbei auf ein Triggersignal der Kamera. Wenn diese für eine Aufnahme bereit ist setzt das Programm die Transmission der ausgewählten Laserwellenlänge auf den vorher bestimmten Wert und gibt der Kamera das Triggersignal zum Starten der Aufnahme. Nach dem Ende der Integrationszeit der Kamera wird die Laseranregung umgehend gestoppt und die Probe bei Bedarf auf die nächste Aufnahmeebene verfahren, während die Kamera das Bild ausliest. Erst wenn diese wieder ihr Bereitschaftssignal für die nächste Aufnahme durch ein Triggersignal sendet bzw. die Probe verfahren wurde, wird die Laseranregung wieder aufgenommen. Somit wird eine schnelle Messung bei minimierter Probenbestrahlung garantiert. Nach Ende der Aufnahme werden die Daten innerhalb der *HoKaWo*-Software als *Image-Stack* abgespeichert und können zur weiteren Datenverarbeitung auf Fremdrechner exportiert werden.

### Datenverarbeitung und Evaluations-Software

Für die Verarbeitung dreidimensionaler Aufnahmen ist es aufgrund der Messaufbauarchitektur notwendig, eine Verschiebung der Einzelaufnahmen zueinander durchzuführen. Dies ist begründet in der  $z$ -Bewegung der Probe, die in einem  $45^\circ$ -Winkel zur Bildebene durchgeführt wird. Ein entsprechende Software-Umgebung zur Durchführung dieser Datenaufbereitung wurde durch Herrn Rolf Fickentscher erstellt [23]. Die *SPIMpac* genannte Software basiert auf der *Matlab*-Programmierungsumgebung der Firma *The MathWorks Inc.* (Natick, Massachusetts, USA) und umfasst Programme zur bereits erwähnten Registrierung von Stack-Aufnahmen, sowie semiautomatisierte Programme zur Mikroskopcharakterisierung, Bilddarstellung und Datenauswertung. Die Software wird im Rahmen der Promotionsarbeit von Herrn Fickentscher beständig weiterentwickelt.

Programme zur Evaluation von Aufnahmen der Embryogenese von *C.elegans* beinhalten ein intensitätsbasiertes Tracking fluoreszenzmarkierter Zellkerne sowie eine Segmentierung von Zellen aus Aufnahmen von Embryonen mit einer fluoreszenzmarkierten Membran. Aufgrund der neuen Möglichkeit Mehrkanalmessungen durchführen zu können, ist es so möglich durch die Verwendung doppelt markierter Wurmlinien sowohl Zelltrajektorien als auch deren Oberfläche aus einer Messung zu bestimmen. Weitere Arten der Datenverarbeitung werden üblicherweise mit *Matlab*-basierten Auswerteskripten oder dem frei erhältlichem Programmpaket *Fiji* [138] getätigt. *Fiji* basiert auf dem Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* [139] des *National Institute of Health* (Bethesda, Maryland, USA) und ermöglicht die Verwendung einer Reihe von zusätzlichen Programmpaketen von privaten Entwicklern. Weitere Details zu Verarbeitung und Evaluation innerhalb bestimmter Teilprojekte finden sich in den Kap. 5 und 6.

### 4.3. Aufbaucharakterisierung

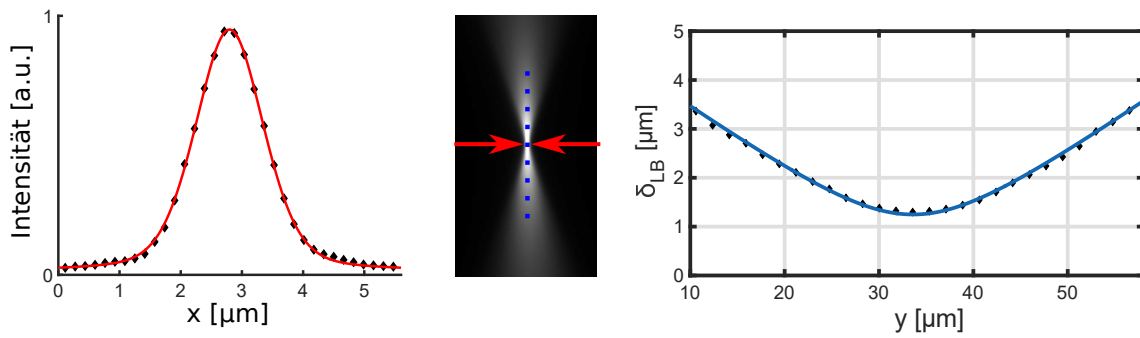
#### Lichtblattdicke und -breite

Die Dicke des Lichtblattes und damit auch die axiale Auflösung ist abhängig von dem verwendeten Anregungsobjektiv und dem Strahldurchmesser. Die minimal erreichbare Dicke  $\sigma_{LB,min}$  des Lichtblatts lässt sich nach Gl. 3.11 für den verwendeten Aufbau abschätzen zu

$$\sigma_{LB,min}(\lambda = 491nm) = \frac{1,33 * 0,491\mu m}{\pi * 0,3} = 0,69\mu m$$

$$\sigma_{LB,min}(\lambda = 561nm) = \frac{1,33 * 0,561\mu m}{\pi * 0,3} = 0,79\mu m$$

Dies würde aufgrund der Rayleighlänge jedoch nur einen sehr kurzen messbaren Bereich der Tiefe  $2 \cdot 3,1\mu\text{m} = 6,2\mu\text{m}$  bzw.  $2 \cdot 3,5\mu\text{m} = 7\mu\text{m}$  ergeben. Um das Lichtblatt auf einer längeren Abmessung ungefähr gleich dick zu halten, wird die NA des Anregungsobjektivs reduziert, indem die hintere Apertur der Optik nicht komplett ausgeleuchtet wird. Die NA kann grob aus dem Durchmesser  $d$  und der Brennweite  $f$  der Optik mit  $NA = \frac{d}{2f}$  abgeschätzt werden. Der Durchmesser beträgt für das verwendete Anregungsobjektiv  $d = 12\text{mm}$ . Über die Verwendung eines Strahls mit einem Durchmesser kleiner  $d$  kann so die NA reduziert und die Lichtblattstärke und Rayleighlänge vergrößert werden. Die Lichtblattstärke wurde experimentell über eine Messung des Strahlprofils in einer Probe aus 1%-Agarose (*Agarose Low Melt* von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und dem Farbstoff Alexa488 (*Alexa Fluor 488* von Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgenommen (siehe auch [78]) und der Strahldurchmesser mit einem *Matlab*-basiertem Auswerteprogramm [23, 78] ausgewertet (siehe Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Gemessenes Lichtblattprofil**

Zur Abschätzung der Lichtblattstärke wird der Gaußstrahl in einer fluoreszenten *Alexa488*-Probe in 1% Agarose aufgenommen. Durch das Fitten mehrerer Intensitätsprofile (linker Graph in der Abbildung) senkrecht zur Strahlachse mit einem Gaußprofil (rote Kurve) kann so die Lichtblattstärke experimentell bestimmt werden. Durch einen Fit der so ermittelten Werte für  $\sigma_{LB}(y)$  nach Gl. 3.10 (blaue Kurve im rechten Graphen der Abbildung) lässt sich die minimale Lichtblattstärke bestimmen.

Theoretische und gemessenen Werte für unterschiedliche Strahldurchmesser  $\sigma_{Strahl}$  sind in Tab. 1 gelistet. Die ermittelten Werte für kleine Strahldurchmesser liegen leicht oberhalb der erwarteten Werte der obigen Abschätzung, nähern sich für größere Strahldurchmesser allerdings den theoretischen Werten an. Die gemessenen Werte stimmen mit den Werten aus anderen Publikationen weitgehend überein [140].

Die Lichtblattbreite im DSLM-Ansatz ist über den Verfahrweg des Galvospiegelpaares gegeben. Bei einer Amplitude der angelegten Dreiecksspannung von  $\pm 0,2\text{V}$  entspricht dies einer Lichtblattbreite von  $140\mu\text{m}$  in der Probenebene. Die Breite wird größer als die entsprechende Probendimension in  $x$  gewählt, um störende Effekte bei der Umlenkung des Strahls an den Rändern der Probe aufgrund einer zu langen Probenanregung zu vermeiden. Die Lichtblattbreite bei der Verwendung der Zylinderlinse ergibt sich aus der Vergrößerung aus Zylinderlinsenbrennweite ( $f_{Zyl} = 25\text{mm}$ ) und der Brennweite des Anregungsobjektivs ( $f_{Obj} = \frac{d}{2NA} = \frac{12\text{mm}}{0,6} = 2\text{mm}$ ) mit  $M = \frac{f_{Obj}}{f_{Zyl}} = \frac{1}{12,5}$ . Bei Strahldurchmessern von  $1,75 - 8,75\text{mm}$  resultiert dies in Lichtblattbreiten von ca.  $140 - 700\mu\text{m}$ . Über eine Maske, die den Strahl vor der Linse in  $x$  begrenzt, könnte diese theoretisch auch weiter angepasst bzw. reduziert werden.

$\lambda = 491\text{nm}$			
$2 \cdot \sigma_{\text{Strahl}}$	$\sigma_{\text{LB,theo}}[\mu\text{m}]$	$\sigma_{\text{LB,exp}}[\mu\text{m}]$	$y_R[\mu\text{m}]$
$> 12\text{mm}$	0,69 (theo)	-	3,07 (theo)
1,75mm	4,75	$6,4 \pm 0,4$	262
2,63mm	3,17	$2,5 \pm 0,3$	40
6,30mm	1,32	$1,2 \pm 0,2$	8,8
8,75mm	0,95	$1,0 \pm 0,2$	6,7

$\lambda = 561\text{nm}$			
$2 \cdot \sigma_{\text{Strahl}}$	$\sigma_{\text{LB,theo}}[\mu\text{m}]$	$\sigma_{\text{LB,exp}}[\mu\text{m}]$	$y_R[\mu\text{m}]$
$> 12\text{mm}$	0,79 (theo)	-	3,5 (theo)
6,30mm	1,51	$1,5 \pm 0,2$	14,1

**Tab. 1: Theoretische und gemessene Lichtblatttdicken**

Gezeigt sind die theoretisch erreichbaren Lichtblatttdicken nach Kap. 3.1.6 für einen reduzierten Strahldurchmesser auf der hinteren Apertur des Objektivs und einer dadurch reduzierten NA. Zudem sind die experimentell bestimmten Werte für die zwei verwendeten Anregungslaserwellenlängen und die dementsprechenden Rayleighlängen  $y_R$  nach Gl. 3.12 dargestellt (der Fehler entspricht der Standardabweichung der Messungen). Für beide Wellenlängen liegen die gemessenen Werte für größere Strahldurchmesser im Bereich der theoretisch erwarteten Werte.

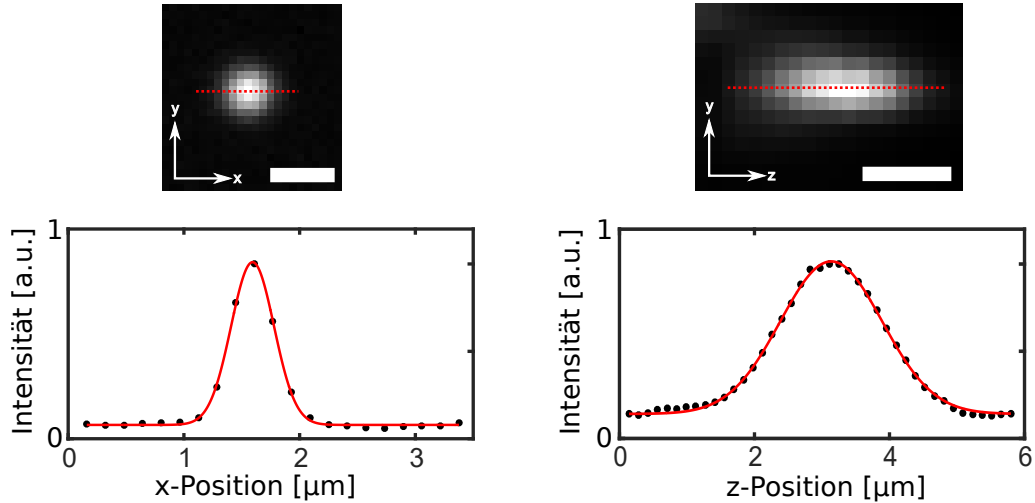
#### Lichtblatttaillenverschiebung zwischen Zylinderlinse und DSLM

Bei der Verwendung der Zylinderlinse zur Lichtblattformung tritt eine unerwartete Verschiebung der Lichtblatttaillenposition entlang der Strahlausbreitungsrichtung auf. Die Taille des Lichtblatts befindet sich hierbei ca.  $(11 \pm 2)\mu\text{m}$  näher am Anregungsobjektiv im Vergleich zum Gaußstrahl bzw. der Lichtblatttaille im DSLM-Ansatz [141]. Der Grund für diese Verschiebung könnte ein ungewollter Einfluss der Zylinderlinse auf die Fokussierung in  $z$  sein. Hierdurch könnte die Kollimation in  $z$  verloren gehen, was zu einer Verschiebung der Fokusposition führen würde. Dies hatte im Rahmen der Fehler keinen Einfluss auf die in Tab. 2 ermittelten Werte für die Auflösung und lässt sich bei Bedarf über eine Verschiebung der Detektionsobjektivposition kompensieren. Weitere Details hierzu, insbesondere im Kontext von SPIM-FCS-Messungen, finden sich in [141].

#### Pixelabmessungen und Auflösung

Die Pixelabstände in der Bildebene ergeben sich aus dem physischen Pixelabstand des Kamerasensors ( $6,5\mu\text{m}$  für die verwendete *Orca Flash4.0*) und der Vergrößerung des Detektionsobjektivs (40x). Hieraus ergibt sich für die verwendeten Bauteile ein Pixelabstand von  $6,5\mu\text{m}/40 = 162,5\text{nm}$ . Dies wurde experimentell über Aufnahmen an einer  $\mu\text{m}$ -Skala der Firma Graticules Ltd. (Kent, England) und einem gemessenen Wert von  $(161,6 \pm 1,1)\text{nm}$  verifiziert [78]. Zur Bestimmung der Auflösung in lateraler und axialer Dimension werden kleine Kugeln (im Nachfolgenden **Beads** genannt) aus Polystyrol, die mit Fluorophoren eingefärbt wurden (*FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres 0.2μm* der Firma Invitrogen) verwendet. Ihr Durchmesser beträgt 200nm ist somit unterhalb der theoretisch erwarteten Auflösungsgrenze. Aufgrund der Faltung der MDE mit der endlichen Probenabmessung ist aus diesen Messungen eine leichte Überschätzung der System-PSF möglich. Die Kugeln werden in einer ausreichend verdünnten Lösung (typischerweise 1:2000 bzgl. der Stocklösung mit einem Feststoffgehalt von 2%) in einer 1% Agaroselösung präpariert und als Tropfen auf einem Deckglas aufgetragen, so dass die einzelnen Beads ortsfest in der Probe verteilt sind. Mit einem Absorptions- und Emissionsmaximum bei 505nm / 515nm sind diese für die Anregung mit der 491nm Wellenlänge





**Abb. 4.3: Intensitätsprofile durch fluoreszente Beads zur PSF-Bestimmung**

Gezeigt sind die laterale und axiale Abbildung der Stack-Aufnahme eines Beads ( $d = 200\text{nm}$ ) für eine Anregung bei  $491\text{nm}$ . Die eingezeichneten Längenskalen betragen  $500\text{nm}$  für die linke und  $1\mu\text{m}$  für die rechte Aufnahme. Unterhalb der Aufnahmen sind exemplarische Intensitätsprofile zur Bestimmung der PSF aufgetragen. Der Fit einer Gaußfunktion (rot) erfasst die Verteilung der Pixelwerte der Intensität (schwarz) und dient zur Bestimmung der Auflösungen  $\sigma_{xy}$  bzw.  $\sigma_z$  in Tab. 2.

geeignet. Aufgrund der hohen Emission und einer möglichen Anregung bei  $561\text{nm}$  (bei erhöhter Laserleistungen aufgrund der niedrigeren Anregungseffizienz) ist so auch eine Quantifizierung des zweiten Anregungs- bzw. Detektionskanals möglich. In einer Stack-Aufnahme werden hierfür 200 einzelne Schichten mit einer PIFOC-Schrittweite von  $200\text{nm}$  aufgenommen.

$\lambda = 491\text{nm}$				
$\sigma_{\text{LB,exp}}[\mu\text{m}]$	$\sigma_{xy,\text{theo}}[\text{nm}]$	$\sigma_{xy,\text{exp}}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,\text{theo}}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,\text{exp}}[\text{nm}]$
0,69 (theo)	528	-	647	-
$6,4 \pm 0,4$	528	$460 \pm 50$	1735	$1810 \pm 100$
$2,5 \pm 0,3$	528	$462 \pm 41$	1462	$1420 \pm 231$
$1,2 \pm 0,2$	528	$434 \pm 42$	981	$1130 \pm 243$
$1,0 \pm 0,2$	528	$424 \pm 48$	888	$1019 \pm 261$

$\lambda = 561\text{nm}$				
$\sigma_{\text{LB,exp}}[\mu\text{m}]$	$\sigma_{xy,\text{theo}}[\text{nm}]$	$\sigma_{xy,\text{exp}}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,\text{theo}}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,\text{exp}}[\text{nm}]$
0,79 (theo)	589	-	737	-
$1,5 \pm 0,2$	589	$443 \pm 65$	1195	$1328 \pm 345$

**Tab. 2: Theoretische und gemessene Werte der lateralen und axialen Auflösung für unterschiedliche Lichtblattstärken**

Gezeigt sind die nach Unterkap. 3.1.6 erwarteten theoretischen Werte der Auflösung für die in Tab. 1 bestimmten Lichtblattstärken und eine Detektion bei  $515\text{nm}$  bzw.  $575\text{nm}$ . Die experimentell bestimmten Werte der lateralen Auflösung sind für die beide Anregungswellenlängen  $491\text{nm}$  und  $561\text{nm}$  und eine Detektion bei  $505\text{--}900\text{nm}$  bzw.  $565\text{--}900\text{nm}$  geringer als die theoretisch erwarteten Werte während die Werte der axialen Auflösungen im erwarteten Bereich liegen.

Die Auswertung der PSF erfolgt über eine durch Herrn Fickentscher entwickelte *Matlab*-Software [23] und ergibt vergleichbare Werte für andere Auswerte-Programme (z.B. [142]). In der Auswertung werden einzelne Beads aus der 3D-Aufnahme selektiert und die PSF über einen Fit mit einer Gauß-Funktion an den Intensitätsprofilen durch die Beads in den drei Raumdimensionen der Aufnahme bestimmt (siehe Abb. 4.3). Eine einzelne Auswertung der PSF in einer Region der lateralen Abmessungen  $(50 \times 50) \mu\text{m}^2$  um die Lichtblattdicke umfasst dabei typischerweise 10-20 einzelne Beads. In Tab. 2 sind die theoretisch erwarteten und experimentell bestimmten Werte der PSF für unterschiedliche Lichtblattdicken aus mehreren Messungen aufgeführt. Die gemessenen Werte der lateralen Auflösung sind hierbei leicht niedriger im Vergleich zu den theoretischen Erwartungen aus Kap. 3.1.6 während die Werte der axialen Auflösung weitgehend mit den theoretischen Erwartungen und Publikationen mit vergleichbaren Systemen übereinstimmen [140]. Die Werte der axialen Auflösung für ein Weitfeld- und eine Konfokalmikroskop bei der Verwendung des gleichen Detektionsobjektivs und einer Detektion im Bereich 515nm sind  $\sigma_{z,\text{WF}} = 1802\text{nm}$  bzw.  $\sigma_{z,\text{Konf}} = 1275\text{nm}$ . Somit ist die axiale Auflösung eines Lichtblattmikroskops ab einer Lichtblattdicke von ca.  $1\mu\text{m}$  bereits höher als die eines vergleichbaren Konfokalmikroskops.

#### Aufnahmedauer einer Stack-Aufnahme und Anregungsdauer der Probe

Einer der Vorteile eines Lichtblattmikroskops ist die vergleichsweise schnelle Aufnahmedauer einer dreidimensionalen Aufnahme bei hoher Auflösung. Die Aufnahmedauer dieses Aufbaus ergibt sich aus der Belichtungszeit für die Aufnahmen der einzelnen Ebenen und der Wartezeit für die Bewegung des Probenpositionierers in  $z$ . Zu diesen Zeiten kommen zusätzliche systeminherente Wartezeiten zwischen den einzelnen Schritten in der Langzeitaufnahme. Die Aufnahmedauer einer einzelnen Schichtaufnahme beträgt dabei

$$T_{\text{Stack}} = 200\text{ms} + n \cdot (t_{\text{Kamera}} + t_{\text{Software}}) + (n - 1) \cdot t_{\text{PIFOC}} \quad (4.1)$$

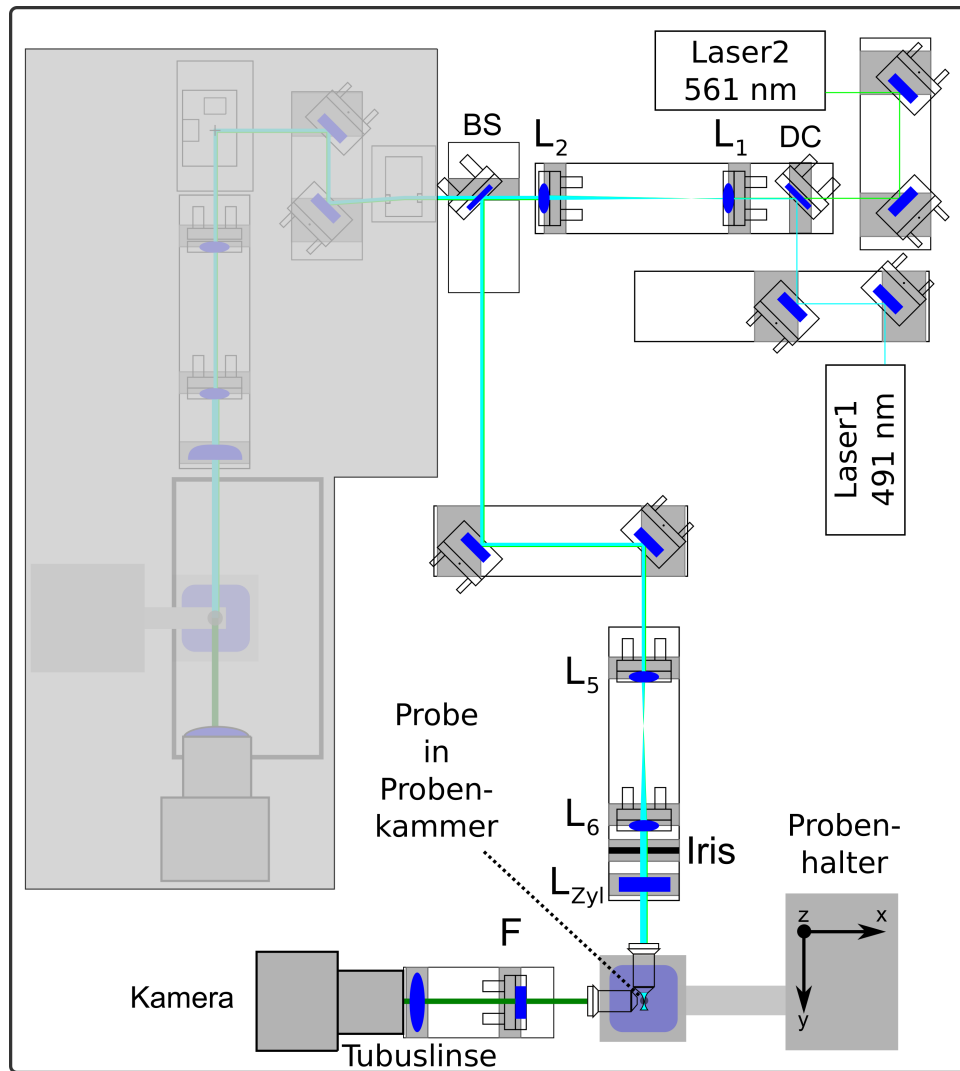
mit einer initialen Wartezeit von 200ms für das Erreichen der ersten Position, der Schichtanzahl  $n$ , der Kamerabelichtungszeit  $t_{\text{Kamera}}$ , die typischerweise bei 20 – 50ms liegt, einer software-abhängigen Zeitdauer  $t_{\text{Software}} = 20\text{ms}$  und einer Wartezeit nach der PIFOC-Ansteuerung von  $t_{\text{PIFOC}} = 60\text{ms}$ . Bei Mehrkanalmessungen erfolgt die Aufnahme beider Kanäle in der gleichen Ebene nacheinander, was zu einer entsprechenden Verlängerung der Aufnahmedauer gemäß

$$T_{\text{Stack,Mehrkanal}} = 200\text{ms} + 2n \cdot (t_{\text{Kamera}}) + n \cdot t_{\text{Software}} + (n - 1) \cdot t_{\text{PIFOC}} \quad (4.2)$$

mit einer größeren Dauer  $t_{\text{Software}} = 29\text{ms}$  führt. Durch den Einbau eines AOTF zur schnellen Intensitätsmodulation konnte die Zeit, in der die Probe beleuchtet wird, und damit auch der Photostress auf die Probe nochmals drastisch reduziert werden. Die Ansteuerungszeit des AOTF liegt bei Werten  $t < 4\mu\text{s}$  und ist damit vernachlässigbar klein im Vergleich zur typischen Belichtungszeit. Während einer Aufnahme wird die Anregung durch den Laser so nur noch auf die Belichtungszeit der Kamera begrenzt. Die Dauer einer Stack-Aufnahme von  $n = 51$  Schichten mit einer Belichtungszeit von 50ms und einer fixen PIFOC-Wartezeit von 60ms beläuft sich so auf 6,8s bzw. 9,8s für eine Mehrkanalmessung. Hierbei ist die Probe jedoch nur für  $n \cdot 50\text{ms} = 2,55\text{s}$  bzw. 5,1s dem Anregungslicht ausgesetzt. In einer früheren Version des Aufbaus [16, 78] wurde die Probe aufgrund der langsamen Ansteuerung eines physischen Shutters auch über die komplette Verfahrdauer hinweg beleuchtet, was zu vergleichsweise höherem Photostress und einer Reduzierung der maximal möglichen Aufnahmedauern führte.

#### 4.4. Zweiter SPIM-Aufbau

Der zusätzliche Aufbau gleicht dem oben beschrieben in der grundlegenden Konzeptionierung. Der größte Unterschied zum vorherigen Aufbau ist eine horizontale Ausrichtung der optischen



**Abb. 4.4: Skizze des zweiten SPIM-Aufbaus**

Die Strahlen werden am Strahlteiler (BS) aufgeteilt und über zwei Spiegel auf einen Teleskopaufbau aus zwei Linsen  $L_{5,6}$  gelenkt. Nachdem die Strahlen dort aufgeweitet wurden passieren diese eine verstellbare Irisblende und treffen auf eine Zylinderlinse  $F_{Zyl}$ , die zu einer Fokussierung in  $z$  führt. Das Anregungsobjektiv formt so mit der Zylinderlinse das statische Lichtblatt in der Fokusposition. Durch Variation der Irisblende kann der Strahldurchmesser auf der hinteren Apertur des Objektivs und damit auch die Lichtblattdicke verändert werden. Anregungs- und Detektionsobjektiv befinden sich in orthogonaler Ausrichtung in der flüssigkeitsgefüllten Probenkammer. Die Probe selbst wird von oben in die Probenkammer eingeführt und über den motorisierten Probenhalter verschoben. Das vom Detektionsobjektiv gesammelte Fluoreszenzsignal wird über einen Filter  $F$  von Anregungsstreulicht gereinigt und über eine Tubuslinse auf den Kamerasensor abgebildet.

Achsen des Anregungs- und Detektionsobjektiv zum Probenstisch. Dies erlaubt eine Probenpräparation „von oben“, das heißt, dass insbesondere flüssige Proben als kleine Probensäckchen präpariert und von oben in den Fokus bzw. das Lichtblatt geführt werden können [107]. Das erforderte die Konzeptionierung einer Probenkammer, in der die beiden Immersionsobjektive eingeführt werden können, ohne dass die Flüssigkeit in der Kammer austritt. Die hier gewählte

Objektivausrichtung ist somit vergleichbar zu den meisten üblicherweise verwendeten Lichtblattmikroskopen [69]. Eine Skizze dieses Aufbaus ist in Abb. 4.4 zu sehen. Eine Liste der verwendeten Komponenten sowie ein Bild des Aufbaus befindet sich im Anhang dieser Arbeit in Tab. 13 und Abb. D.2. Die Justage des Aufbaus ist vergleichbar mit der bereits für den oben beschriebenen Aufbau erläuterten Prozedur.

### Anregungsstrahlengang

Zur Anregung bzw. Lichtblattformung werden Teile der beiden Laserlinien des zuvor beschriebenen Aufbaus durch einen Strahlteiler *BSW10* (Thorlabs) ausgekoppelt. Die Strahlen werden über zwei Spiegel auf die optische Achse einer Schiene gelenkt, auf der ein Teleskopaufbau aus zwei Linsen  $L_{5,6}$  (*AC254-xxx-A* mit unterschiedlichen Brennweiten, Thorlabs) die Strahlen aufweitet und kollimiert. Die Strahlen werden damit insgesamt um den Faktor  $M = \frac{f_6 f_2}{f_5 f_1}$  bezüglich ihrer ursprünglichen Strahldurchmesser vergrößert. Eine verstellbare Irisblende (*IB-D54*, Owis) dient zur zusätzlichen Variation des Strahldurchmessers und damit auch der Lichtblattdicke. Über eine Zylinderlinse (*LLJ1629L1-A*, Thorlabs) wird der Strahl in  $z$  (senkrecht zur Tischebene) auf die BFP des Anregungsobjektivs *HCX APO L 10x/0.30 W U-V-I* (Leica Microsystems) fokussiert. Dadurch entsteht ein statisches Lichtblatt in der  $z$ - $y$ -Ebene. Die Position des Objektivs entlang der optischen Achse lässt sich über einen Linearverschiebetisch justieren.

### Probenkammer, Probenpositionierung und Durchlichtquelle

Die Probenkammer besteht aus durchsichtigem Kunststoff auf einer Aluminiumplatte und verfügt über zwei Öffnungen an den Seiten für die verwendeten Immersionsobjektive. Diese werden über Dichtungsringe abgedichtet, um ein Austreten der Flüssigkeit zu verhindern, während eine Nachjustage der Objektive möglich bleibt. Der Probenpositionierer besteht aus einem  $xyz$ -Setup aus drei motorisierten Linearverschiebetischen (*MTS50/M-Z8*, Thorlabs). Am letzten Verschiebetisch ist ein Eigenbau-Probenhalter angebracht, in dem sich unter anderem Greifer und dünne Kanülen zur Probenanbringung montieren lassen. Über eine LED-Lampe (*JANSJÖ Arbeitsleuchte*, INGKA Holding B.V., Leiden, Niederlande) können Durchlichtaufnahmen der Probe erstellt werden. Eine Verschiebung in  $x$  ermöglicht die Erstellung von Stack-Aufnahmen der Proben.

### Detektionsstrahlengang und Kamerasensor

Ein zweites Objektiv *HCX APO L 40x/0.80 W U-V-I* (Leica Microsystems) dient zur Detektion der angeregten Fluoreszenz in der Probe. Dieses lässt sich wiederum entlang seiner optischen Achse über einen Linearverschiebetisch justieren, um die fokale Ebene des Objektivs mit dem Lichtblatt in Deckung zu bringen. Ein Detektionsfilter  $F$  (*FF01-531/46-25* oder *BLP02-561R-25*, Semrock) dient zum Blocken von gestreutem Anregungslicht während eine Tubuslinse (*AC508-200-A*, Thorlabs) das so bereinigte Signal auf den Kamerasensor einer CCD-Kamera (*DFC 360 FX*, Leica Microsystems) abbildet.

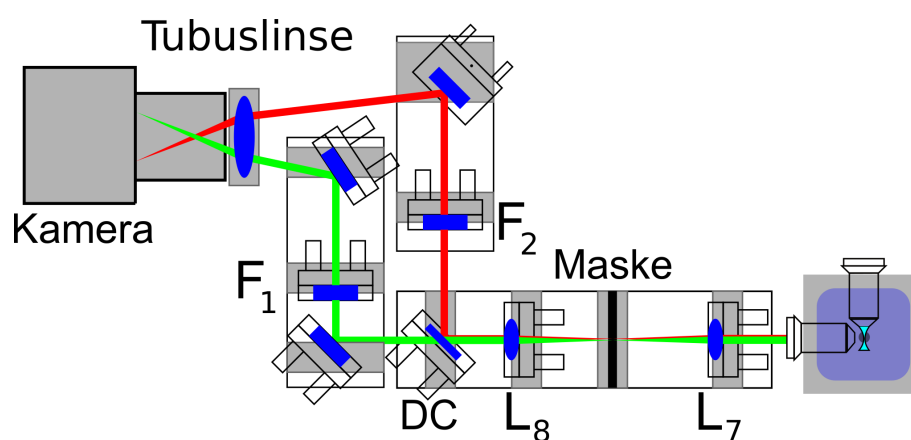
### Kontrollsoftware, Datenverarbeitung und -evaluation

Zur Ansteuerung des Messaufbaus wird ein *CELSIUS W520* der Firma Fujitsu K.K. (Tokio, Japan) mit 16 GB Arbeitsspeicher, einen *Intel® Xeon® Processor E3-1220V2 @ 3.10 GHz -Prozessor* und einem *Windows 7 Professional 64-bit* -Betriebssystem verwendet. Die Ansteuerung der Komponenten erfolgt für die Anregungslaser, wie weiter oben beschrieben, über *LabVIEW*. Die Probenpositionierer *MTS50/M-Z8*, sowie die Kamera *DFC 360 FX* werden gemeinsam über die Open-Source Softwareumgebung *μ-Manager* [143] oder bei getrennter Verwendung durch die Software *LAS AF 2.7* (Leica Microsystems) und *μ-Manager* angesteuert. Die Kontroll-Software umfasst folgende Parameter und Aufnahmemodi:

- Laserleistung der beiden Anregungslaser
- Motor-Position bzw. Verfahrbereich, Schrittweite und -anzahl für eine Stack-Aufnahme
- Parameter zur Langzeitaufnahme von 3D-Stacks (Stackanzahl, Zeitabstand)
- Kameraparameter (Belichtungszeit, Binning, Bit-Tiefe, ROI-Auswahl, Clockrate)

### Projektbeschreibung des Aufbaus

Der Aufbau wurde vorrangig entwickelt, um Messungen an flüssigen Proben (z.B. Beads in wässriger Lösung) mit unterschiedlichen Lichtblatttdicken aufzunehmen und nach der DDM-Methode auszuwerten. Die Probenpräparation von oben ermöglicht hier andere Herangehensweisen im Vergleich zum zuvor beschriebenen Versuchsaufbau. Durch die modulare Aufbauweise können zudem unkompliziert Teile ausgetauscht werden und so unterschiedliche Messungen an einem breiten Probenspektrum durchgeführt werden. Zudem ist eine Erweiterung des Detektionsarms für die Durchführung gleichzeitiger Doppelkanalmessungen auf einem Kamerasensor geplant [144]. Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit sind bereits alle notwendigen Optiken hierfür eingetroffen. Hierbei wird das detektierte Signal wellenlängenabhängig von einem Dichroiten aufgespalten und auf zwei unterschiedliche Bereiche des Kamerasensor abgebildet (siehe Abb. 4.5). Hierdurch können zeitgleich mehrere Fluorophore angeregt und detektiert werden. Zudem sind so auch Kreuzkorrelationsmessungen zwischen unterschiedlichen Wellenlängen nach der SPIM-FCCS-Technik möglich [102, 107].



**Abb. 4.5: Detektionspfad für Doppelkanalmessungen**

Das detektierte Signal wird zunächst über einen Teleskopaufbau aus zwei Sammellinsen  $L_{7,8}$  auf eine Maske fokussiert, um den Bildausschnitt aus der Probenebene zu limitieren. Ein Dichroit (DC) trennt den Strahl in zwei Wellenlängenbereiche auf. Über weitere Detektionsfilter  $F_{1,2}$  werden die Strahlen selektiert. Die beiden Detektionsstrahlengänge werden nun gemeinsam unter einem Winkel auf die Tubuslinse gelenkt, so dass die entsprechenden Wellenlängen auf zwei räumlich getrennten Bereichen des Kamerasensors aufgenommen werden.

Eine weitere Charakterisierung dieses Aufbaus ist Bestandteil der Bachelorarbeit von Herrn Lukas Wehmayer [137] und wird daher an dieser Stelle nicht weiter vorgenommen.

## 5. Aufnahmen der frühen Embryogenese von C. elegans

*Dieses Kapitel beschreibt den Einsatz des zuvor behandelten Versuchsaufbaus zur Erstellung von Langzeitaufnahmen der frühen Embryogenese des Fadenwurms C. elegans. Erste Ergebnisse des hier vorgestellten Projekts wurden bereits in den Diplomarbeiten des Verfassers dieser Arbeit [78] sowie von Herrn Rolf Fickentscher [23] behandelt und zu Beginn der vorliegenden Arbeit publiziert [16]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit und der Promotionsarbeit von Herrn Fickentscher wurde das Projekt weiter vertieft. Die Weiterentwicklung des Aufbaus und insbesondere die neue Möglichkeit zur Aufnahme von Mehrkanalmessungen bei einer regulierten Umgebungstemperatur ermöglichte die Veröffentlichung neuer Ergebnisse in Form einer weiteren kollaborativen Publikation [17]. Darüber hinaus führten die am Aufbau getätigten Aufnahmen zu einer weiteren Publikation durch Herrn Fickentscher [145].*

*Die Entwicklung des verwendeten Versuchsaufbaus, die Programmierung der Kontrollsoftware, die Entwicklung von Methoden zur Probenpräparation und die frühen Messungen wurden hierbei vom Autor dieser Arbeit vorgenommen. Zusätzliche Messungen, die Programmierung der Evaluationssoftware, die Datenevaluation und begleitende Simulationen wurden von Herrn Fickentscher im Rahmen seiner Diplom- und Promotionsarbeit am Lehrstuhl durchgeführt. Die für die Datenevaluation verwendeten Methoden werden daher in dieser Arbeit nur kurz angesprochen. Im Folgenden werden die Durchführung der Langzeitaufnahmen und ausgewählte Ergebnisse vorgestellt.*

### **Zielsetzung, Motivation und Proben**

Eines der ersten Forschungsprojekte am Lehrstuhl, für welches der vorgestellte SPIM-Aufbau konzipiert wurde, ist die Langzeitaufnahme der frühen Embryogenese des C. elegans. Die Embryogenese des Fadenwurms hat sich als sehr robust und wiederholgenau erwiesen, was bislang größtenteils auf eine Reihe biochemischer Prozesse und Regulationen zurückgeführt wurde [14, 21, 25]. Die erste Fragestellung, die mit dem vorgestellten SPIM-Aufbau angegangen wurde, war daher, inwiefern unterschiedliche Aspekte der Embryogenese Variationen unterworfen sind bzw. von welchen weiteren Faktoren die Robustheit der Embryogenese abhängen könnte. Hierbei standen mögliche physikalisch motivierte Gesetzmäßigkeiten sowie die Untersuchung weiterer kritischer Einflussparameter abseits der reinen Biochemie und Genetik im Fokus der Untersuchungen. Die Eigenschaft der Eutelia ermöglicht hierbei einen direkten Vergleich des Verhaltens einzelner Zelllinien und der gesamten Embryogenese zwischen unterschiedlichen Individuen. Das Ziel war zunächst eine Messapparatur zu schaffen, um dreidimensionale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von Embryonen über einen Zeitraum von der Befruchtung des Eis bis mindestens zum Beginn der Gastrulation (ca. im 26-Zellzustand) erstellen zu können, ohne den Embryo dabei zu schädigen bzw. in seiner Entwicklung zu beeinträchtigen. Zusätzlich sollte eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung erreicht werden, indem möglichst schnelle Stack-Aufnahmen in zeitlich kurzen Abständen bei einem ausreichend hohen Signal-Rausch-Verhältnis getätigt werden. Um unterschiedliche Aspekte der Embryogenese im selben Individuum untersuchen zu können, wurde in einem späteren Schritt die Implementierung von Mehrkanalmessungen im Zusammenhang mit der Verwendung unterschiedlicher Fluorophormarkierungen an verschiedenen Zellkompartimenten notwendig. Eine Erhöhung des Photostresses in der Probe muss aufgrund der verdoppelten Aufnahmenanzahl zudem durch eine zeitliche Reduzierung der Probenanregung auf die eigentliche Kameraaufnahmedauer kompensiert werden. Eine zusätzliche Kontrolle der Umgebungstemperatur durch eine entsprechende beheizbare Probenkammer ermöglicht darüber hinaus die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit unterschiedlicher Aspekte der Embryogenese. Die hier dargestellten Anforderungen an den Aufbau werden durch die in Kap. 4 vorgestellten Anpassungen erfüllt. Durch die so ermöglichten Mehrkanalmessungen kann nun

zum einen auf die Einfärbung der Histone zurückgegriffen werden, um Zellanordnungen im Wurm zu untersuchen. Diese sind als Bestandteile des Chromatins zur DNA-Verpackung während der Interphase im Zellkern verteilt und liegen während der Zellteilung kondensiert an den Chromosomen vor. Zur Quantifizierung der Zellformen und -volumina wird eine Fluoreszenzmarkierung des peripheren Membranproteins PLC1 $\delta$ 1 ausgenutzt. Dies liegt in hoher Konzentration an der Membran vor und besitzt auch einen geringeren zytoplasmischen Anteil.

Die für die nachfolgenden Untersuchungen verwendeten Embryos stammen aus stabil transfizierten Wurmlinien, die über das *Caenorhabditis Genetics Center* bezogen wurden. Im Einzelnen wurden folgende Wurmlinien verwendet:

- **XA3501:** GFP::H2B + GFP::tbb-2  
GFP-markierte Histone (H2B) und Mikrotubuli ( $\beta$ -Tubulin) - hierdurch sind Zellkerne, Chromosomen und Spindelapparat fluoreszenzmarkiert
- **OD58:** GFP::PH(PLC1 $\delta$ 1)  
GFP-markiertes PLC1 $\delta$ 1 - hierdurch sind die Zellmembran stark und das Zytoplasma schwach fluoreszenzmarkiert
- **OD95:** mCherry::HIS-58 + GFP::PH(PLC1 $\delta$ 1)  
GFP-markiertes PLC1 $\delta$ 1 und mCherry-markierte Histone (HIS-58) - hierdurch sind Zellmembran und Zytoplasma sowie Zellkerne bzw. Chromosomen fluoreszenzmarkiert

### 5.1. Methoden

#### Probenpräparation und Aufnahme

Details zur Wurm kultivierung, den verwendeten Reagenzien und früheren Formen der Probenpräparation finden sich in [16, 23, 78]. Die Würmer werden auf NGM-Platten (*Nematode Growth Medium*) bei 20,5°C gehalten. Als Nahrungsquelle dient ein zuvor ausgebrachter Bakterienrasen (*Escherichia coli* OP50). Es wird darauf geachtet, nur Würmer von Kulturen zu verwenden, die nicht in jüngerer Vergangenheit in einem Hungerzustand waren, um eventuelle Veränderungen bzw. Abweichungen in der Entwicklung zu vermeiden. Geeignete Individuen (junge adulte Würmer) werden unter einem Durchlichtmikroskop (*Leica S8 APO*, Leica Microsystems) ausgewählt, mit einem abgeflamten Platindraht von der NGM-Platte abgenommen und in einen ca. 50  $\mu$ l großen Tropfen M9-Puffer gesetzt. Dort wird der Wurm mit zwei Kanülen (*NEOPOINT* Größe 20 -  $\varnothing$ 0,40mm, Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland) entlang des Eileiters in der Nähe der Spermathek aufgeschnitten. Der Großteil der Eier quillt so in jungen Würmern selbstständig heraus. Um sehr frühe Eier (direkt nach der Befruchtung) freizulegen, ist es bisweilen nötig, diese durch sanften, beidseitigen Druck auf den Wurm herauszupressen. Geeignete Embryonen (spätestens vor dem *Nuclear Meeting* der beiden Pronuklei) werden selektiert und mit einer Glaskapillare mit einem Spitzendurchmesser von ca. 100 – 200  $\mu$ m und einem angeschlossenen Peleusball aus dem Tropfen gesogen. Der Embryo wird nun mit ca. 10 – 20  $\mu$ l M9-Puffer auf ein im Vorfeld mit Poly-L-lysin (Biochrom, Berlin, Deutschland) beschichtetes Deckgläschen aufgebracht. Die Beschichtung mit Poly-L-lysin macht das Deckgläschen hierbei klebrig, so dass der Embryo anhaftet und sich dieser beim späteren Eintauchen in die gefüllte Probenkammer nicht vom Glas ablöst. Das Deckgläschen wird auf dem Probenhalter des SPIM-Aufbaus mittels Vakuumfett (*Baysilone-Paste*, GE Bayer Silicones GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgebracht und in die mit *Milli-Q-Wasser* (gefiltertes und deionisiertes Reinstwasser aus einer Filteranlage der Firma EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) gefüllte Probenkammer eingebracht. Die Probenkammer selbst wird im Vorfeld auf die gewünschte Messtemperatur des Mediums geheizt (soweit nicht anders genannt beträgt diese 20,5°C). Bei der Probenausrichtung wird

darauf geachtet, die lange Halbachse des ellipsoiden Embryos senkrecht zur Lichtblattstrahlrichtung zu positionieren, um den Embryo entlang des dünnsten Teils des Lichtblattes aufnehmen zu können. Um die Probenfindung zu erleichtern, hat es sich in der Praxis als hilfreich erwiesen, im Vorfeld die grobe Position des Embryos auf dem Deckgläschen durch zwei senkrechte Linien mit einem wasserunlöslichem Stift zu kennzeichnen. Diese Hilfslinien lassen sich über die Beleuchtung mittels der Auflichtlampe am Aufbau in einer Live-Aufnahme finden, was die Probenfindung stark beschleunigt. Nachdem die Abbildung des Embryos in der Mitte des Kamerasensors positioniert wurde, wird die Höhenposition über die manuelle Höhenpositionierung angepasst, um den Verfahrensweg der PIFOC-Einheit auf die Abmessung des Embryos einzustellen. Zur Bildaufnahme wird der DSLM-Ansatz genutzt, um eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probenebene zu garantieren und Abschattungs- bzw. Streifeneffekte insbesondere in späteren Entwicklungsstadien zu minimieren. Dies erfordert eine Synchronisation des an das Galvospiegelpaar angelegten Spannungssignals zur Belichtungszeit der Kamera. Typische Parameterwerte für eine Langzeitmessung der frühen Embryogenese an den erwähnten Wurmlinien sind wie folgt:

- Laserleistung (491nm/561nm): 50mW
- AOTF-Spannung (491nm): 0,5V (Leistung an hinterer Objektivapertur: 0,2mW)
- AOTF-Spannung (561nm): 1,0V (Leistung an hinterer Objektivapertur: 0,6mW)
- Kamerabelichtungszeit: 50ms
- Binning (on-chip):  $1 \times 1$
- ROI:  $(500 \times 600)$  Pixel
- Galvospiegel: Dreiecksspannung  $\pm 200\text{mV}$  bei 20Hz (für eine Belichtungszeit von 50ms)
- PIFOC-Schrittweite: (51/101) Ebenen mit  $(2/1)\mu\text{m}$  Schrittweite
- Stackaufnahme: (180/360) Stacks alle (60/30)s
- Lichtblattdicke: 1,2 – 1,6 $\mu\text{m}$

Die Messung erfolgt nach der in Unterkap. 4.2 beschriebenen Prozedur. Nach Beendigung der Aufnahme wird der Embryo aus dem Messaufbau entfernt und in einer Petrischale mit M9-Puffer aufbewahrt. Das abschließende Schlüpfen des Wurmes fungiert als Qualitätskontrolle zur Überprüfung einer von der Messung unbeeinträchtigten Entwicklung des Embryos.

### **Temperaturabhängige Messungen, RNAi-Experimente und Eihüllenentfernung**

Um den Einfluß externer Einflüsse und Abhängigkeiten von unterschiedlichen, organismusspezifischen Systemgrößen zu testen, werden Aufnahmen der frühen Embryogenese unter folgenden veränderten Bedingungen getätigt:

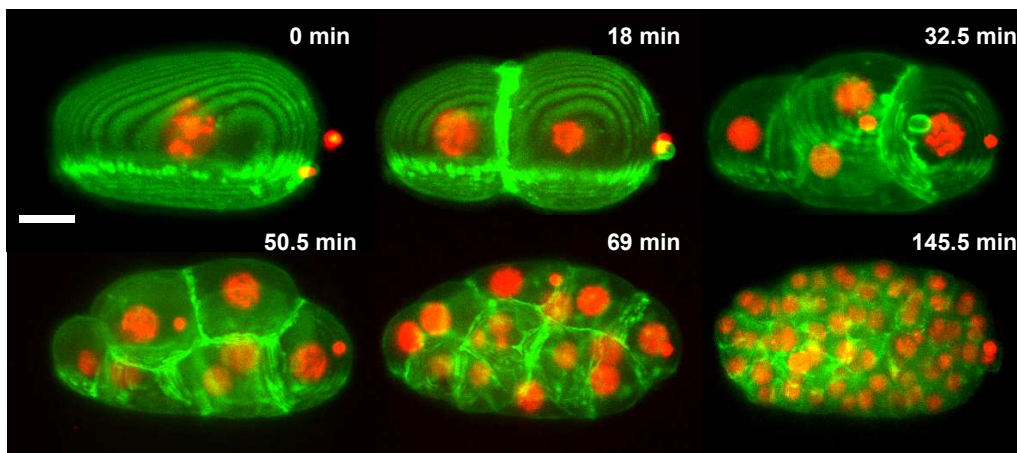
- Temperaturvariation der Umgebung im Bereich von 15 – 25°C
- Größen-Variation der untersuchten Embryonen durch RNAi-Methoden zur Erstellung kleinerer und größerer Individuen (*ima3* und *C27D9.1*)
- Entfernung der Chitin-Eihülle durch Chitinase

Die Temperaturvariation erfolgt hierbei über die in Kap. 4.1 erwähnte Probenkammerheizung. Da diese über das Peltierelement nur heizen kann, wurden Temperaturen unterhalb der Umgebungstemperatur im Laborraum (minimal 18°C) unter Zuhilfenahme eines Wasserkühlkreislaufs



ermöglicht. Dies wurde von Herrn Fickentscher über ein Schlauchsystem realisiert, welches über die Messdauer eine konstante Rate an Eiswasser (ca. 6°C) in die Probenkammer füllt und ein entsprechendes Flüssigkeitsvolumen ablässt. Das Peltierelement kann so die Probenumgebung durch seine Heizleistung an die gewünschte Temperatur anpassen.

Die Größenvariationen der Embryonen durch RNA-Interferenz basieren auf der zielgerichteten Abschaltung von Genen. Hierbei wird die mRNA (*messenger RNA*) eines bestimmten Gens aufgespalten und die zu übertragende Information zerstört bzw. die Proteintranslation behindert. Ein *Knockdown* des Gens *ima3* (importin alpha 3) und *C27D9.1* führt z.B. zu Würmern kleinerer bzw. größerer Abmessungen. Als Methode zur Einbringung der RNAi-Konstrukte wurde ein *Feeding*-Protokoll verwendet [17, 20]. Hierbei werden den Würmern genetisch veränderte Bakterienstämme, welche die dsRNA produzieren, gefüttert. Der gewünschte Effekt lässt sich so in den Nachkommen dieser Würmer beobachten.



**Abb. 5.1: Beispiele einer Langzeitaufnahme der Embryogenese von *C. elegans***

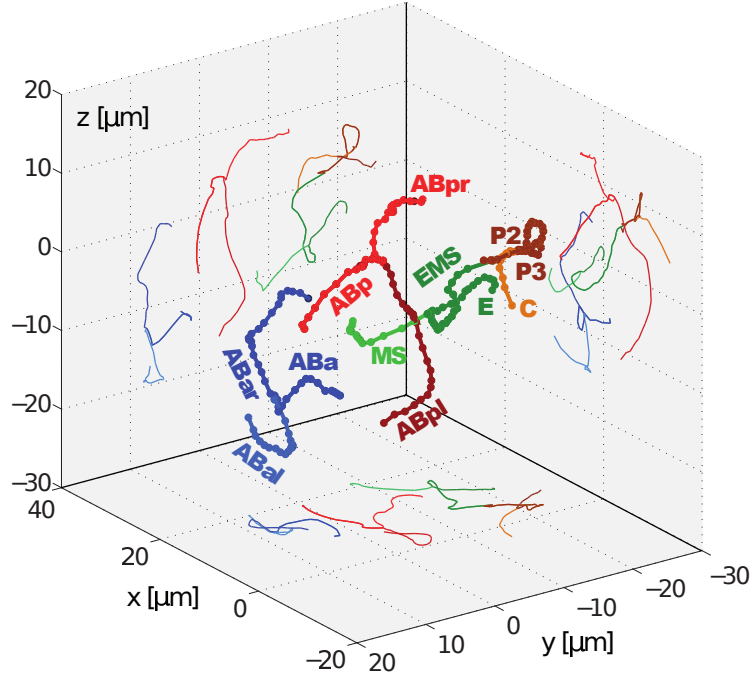
Zu sehen sind sechs Momentaufnahmen in Form von Maximalintensitätsprojektionen in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung während der Embryogenese. Die hier verwendete Wurmlinie **OD95** erlaubt sowohl die Aufnahme der Zellkerne durch eine Histonmarkierung mittels mCherry (rot), als auch eine Aufnahme der Zellmembran über GFP-markiertes PLC1δ1 (grün). Die eingezeichnete Längenskala beträgt 10µm und die Zeitangaben sind bezogen auf die erste Aufnahme im sich teilenden Einzeller.

Die Bedeutung der Einhüllung durch eine feste Chitinhülle kann getestet werden, indem Embryonen ohne Chitinhülle präpariert und deren Entwicklung untersucht werden. Hierbei wird nach der Extraktion eines Embryos dieser auf einem Deckglas für ca. drei Minuten in 30µl einer NaOCL Lösung mit 3% Na gegeben. Nach drei Waschgängen mit M9-Puffer wird 25µl einer Chitinaselösung auf den Embryo gegeben, bis die Chitinhülle nach 10 – 15min aufgelöst ist. Die Chitinaselösung besteht aus 5 Einheiten Chitinase aus *Streptomyces* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 2ml sterilem Ei-Puffer. Hierbei verbleibt zunächst eine einhüllende Vitellin-Schicht um den Embryo, die jedoch wesentlich verformbarer ist im Vergleich zur starren Chitinhülle. Diese ist als Permeabilitätsbarriere wichtig zum Schutz des Embryos vor potentiell ungünstigen Umgebungsbedingungen. Bei Bedarf lässt sich auch diese Vitellinschicht durch eine vorsichtige Manipulation abstreifen [145, 146].

## 5.2. Untersuchung der Zelltrajektorien und mechanisches Modell

Zur Untersuchung der Zelltrajektorien wurde eine auf der *Matlab*-Umgebung basierte Auswerterroutine entwickelt, die anhand einer intensitätsbasierten Lokalisationsfindung die zeitabhängige

gen Positionen der markierten Nuklei im Koordinatensystem des Embryos extrahiert. Details zu den einzelnen Auswerteschritten, sowie den verwendeten Filtern und Korrekturen finden sich in [16, 23]. Beispiele einer hierfür verwendeten Langzeitaufnahme der Embryogenese mittels des vorgestellten SPIM-Aufbaus sowie ein Beispiel der rekonstruierten Trajektorien sind in Abb. 5.1 und 5.2 gezeigt.



**Abb. 5.2: Beispiel von rekonstruierten Zellkerntrajektorien**

Gezeigt sind experimentell ermittelte Zellkerntrajektorien der Zellen im 4-Zellzustand  $ABa$ ,  $ABp$ ,  $EMS$  und  $P_2$ , sowie deren entsprechenden Tochterzellen nach den Zellteilungen. *Abbildung nach [16]*

Die so extrahierten Trajektorien können für mehrere Individuen verglichen werden. Hierfür müssen die Trajektorien zeitlich und räumlich aneinander ausgerichtet werden [16, 23]. Die durchschnittliche Variabilität  $\langle \Delta r \rangle$  der Zellanordnungen für unterschiedliche Embryonen liegt bis zum 12-Zellzustand unterhalb von  $3,5 \mu\text{m}$  und kann somit während der frühen Embryogenese als nahezu deterministisch angesehen werden (siehe Abb. 5.3 A) [16]. Die Trajektorien  $\vec{r}_i(t)$  der Zellen lassen sich hierbei in einem mechanischen Modell durch eine überdämpfte Langevin-Gleichung der Form

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \frac{\Delta t}{\gamma} \left( \vec{F}_{W,i} + \sum_{j \neq i} \vec{F}_{C,ij} \right) + \vec{\epsilon}$$

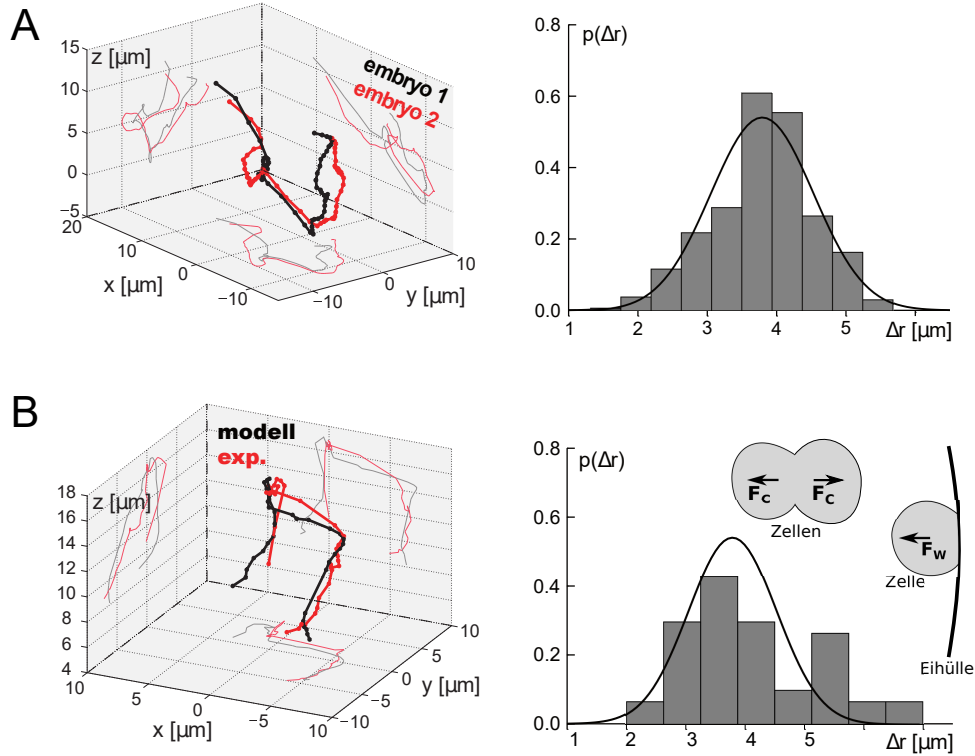
beschreiben. Die Zellen werden hier als verformbare Sphäroiden mit einem Radius  $R_i$  angenommen. Für einen Abstand  $a < R_i$  der Zellen zur Eihülle wirken auf diese repulsive Kräfte der Form

$$\vec{F}_{W,i} = F_{W,0} \left( 1 - \frac{a}{R_i} \right) \vec{e}_n$$

senkrecht zur Eihülle in das Innere des Embryos. Zwischen zwei Zellen wirken für einen Zellabstand  $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j| \leq R_i + R_j$  repulsive Kräfte der Form

$$\vec{F}_{C,ij} = F_0 \vec{e}_{ij} \begin{cases} 1 & , \text{für: } r_{ij} \leq \min(R_i, R_j) \\ \frac{R_i + R_j - r_{ij}}{\max(R_i, R_j)} & , \text{für: } \min(R_i, R_j) \leq r_{ij} \leq R_i + R_j \end{cases}$$

entlang der Richtung  $\vec{e}_{ij} = \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}}$ . Über einen Rauschterm  $\vec{\epsilon}$  werden stochastische Bewegungen der Zellen in das Modell mit aufgenommen. Für weitere Details siehe [16, 23]. Ein Vergleich der durch das Modell simulierten Zelltrajektorien mit den experimentell erhaltenen ergibt Abweichungen in derselben Größenordnung der experimentellen Streuungen zwischen unterschiedlichen gemessenen Individuen und bestätigt somit die Annahme einer mechanisch getriebenen Relaxationsbewegung nach obigem Modell (siehe Abb. 5.3 B). Als Eingabeparameter werden dem Modell in seiner jetzigen Form die experimentell ermittelten Teilungsachsen und Fitparameter zur Bestimmung der Teilungsvolumenverhältnisse sowie zu dem zum Volumen in Abhängigkeit stehenden Zellteilungszeitpunkte vorgegeben (siehe Unterkap. 5.3 und [17, 145]).

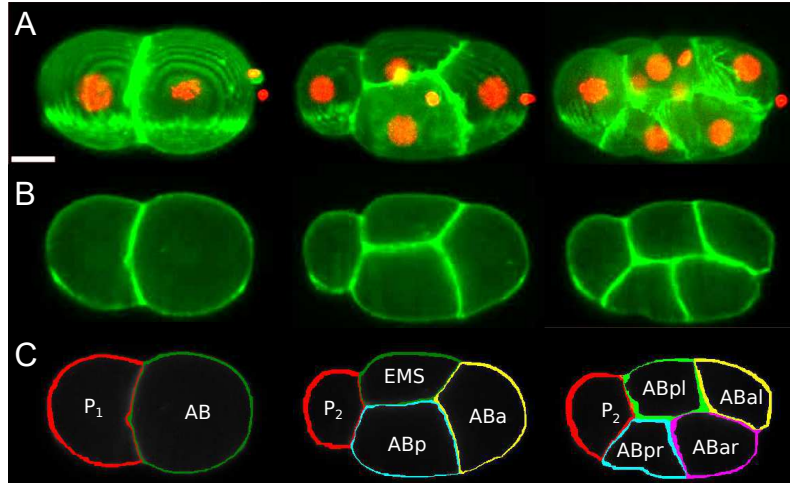


**Abb. 5.3: Vergleich von Zelltrajektorien zwischen unterschiedlichen Individuen und Simulationen**

(A) Gezeigt ist ein Beispiel von Trajektorien derselben Zelle in unterschiedlichen Embryonen. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\Delta r)$  für eine Abweichung  $\Delta r$  der Trajektorien lässt sich über eine Gaußfunktion mit einem Mittelwert im Bereich  $3,5\mu\text{m}$  fitten. (B) Der Verlauf einer simulierten Trajektorie aus dem Modell deckt sich mit einer experimentell bestimmten Trajektorie. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abweichung  $\Delta r$  ist vergleichbar mit den Abweichungen zwischen unterschiedlichen experimentell bestimmten Trajektorien. Das Modell geht von repulsiven Kräften  $\vec{F}_C$  zwischen den Zellen und einer rücktreibenden Kraft  $\vec{F}_W$  der Eihülle aus. Abbildungen nach [16]

### 5.3. Vermessung der Zellvolumina und Teilungszeiten

Die aus den Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Zellkerne ausgelesenen Zellzyklendauern  $T$ , hier definiert als Zeitraum zwischen der Anaphase der Mutterzelle und der Anaphase der untersuchten Tochterzelle, zeigt eine Zunahme der Teilungszeiten für spätere Zellen [17]. Unter der Vermutung einer Volumenabhängigkeit der Teilungszeiten lässt sich durch Mehrkanalmessungen eine mögliche Abhängigkeit der Zellzyklendauern von der Größe der Zelle untersuchen. Zur



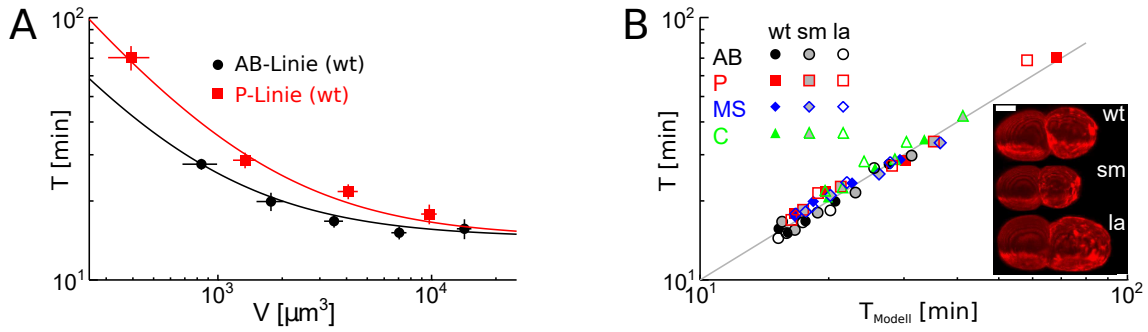
**Abb. 5.4: Beispiele für die Segmentierung zur Volumenbestimmung**

(A) Gezeigt sind drei Maximalintensitätsprojektionen von Stackaufnahmen an der Wurmlinie OD95. Die eingezeichnete Längenskala beträgt 10µm. (B) Einzelne Schichtaufnahmen der in A gezeigten Stackaufnahmen zeigen die erhöhte GFP-Konzentration an der Plasmamembran. Dies wird zur intensitätsbasierten Segmentierung der einzelnen Zellen genutzt. (C) Beispiele einer Segmentierung mit den farbkodierten Randbereichen zeigen die unterschiedlichen erkannten Zellen. Die Segmentierung wird zur Volumen- und Formbestimmung der Zellen verwendet. Abbildungen nach [17]

Bestimmung der Zellvolumina und -formen wird der Membrankanal von Aufnahmen der Linie OD95 über eine intensitätsbasierte Segmentierung der einzelnen Zellen ausgewertet (siehe Abb. 5.4). Bei der Untersuchung der experimentell bestimmten Zellzyklendauern  $T$  ergibt sich eine inverse Abhängigkeit zum jeweiligen Volumen  $V$  der Zellen (siehe Abb. 5.5 A). Diese lässt sich beschreiben gemäß

$$T = \frac{\alpha}{V} + T_M \quad (5.1)$$

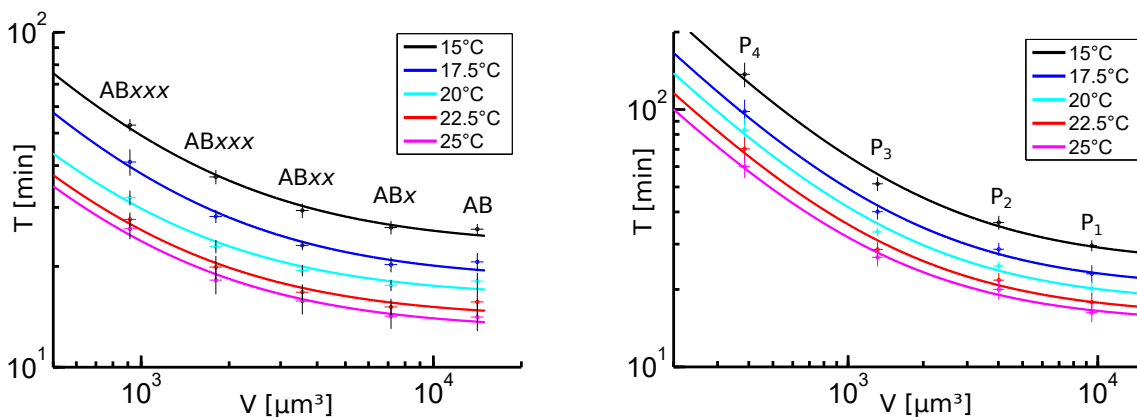
mit einer konstanten Zeit  $T_M$  für die Dauer der Mitose und einer volumenabhängigen Zeitdauer der Interphase  $\frac{\alpha}{V}$ . Zusätzliche RNAi-Messungen mit reduzierten und vergrößerten Zellvolumina bestätigen die kausale Volumenabhängigkeit der Zellzyklendauern (siehe Abb. 5.5 B). Die Volumenabhängigkeit kann im Rahmen eines *limiting-component*-Modell erklärt werden, innerhalb dessen vor Beginn der Mitose zunächst Proteine zur Einleitung der Mitose über eine limitierende Anzahl an Kernporen aus dem Zytoplasma in den Kern gelangen müssen, bis dort eine kritische Konzentration erreicht ist. Der Proportionalitätsfaktor  $\alpha$  unterscheidet sich dabei zwischen Zellen der somatischen Linie und denen der Keimlinie, mit einem ungefähr doppelt so hohen Wert  $\alpha_{\text{Keimlinie}}$  im Vergleich zu  $\alpha_{\text{Somatisch}}$  [17]. Unterschiede zwischen der Keimlinie und den Zellen der somatischen Linie können über biochemische Unterschiede zwischen den beiden Linien erklärt werden. So können z.B. die in den Zellen der Keimlinie vorhandenen *P granules* (Tröpfchen aus Proteinen und RNA) die Rate, in der die Komponenten über die Kernporen in den Zellkern gelangen, potentiell reduzieren, indem sie einen Teil der Kernporen besetzen [17]. Messungen für unterschiedliche Umgebungstemperaturen zeigen verschobene Werte für  $\alpha$  und  $T_M$  gemäß einer Arrhenius-Skalierung mit einer leicht geringeren Temperaturabhängigkeit der Mitosedauer  $T_M$  im Vergleich zu  $\alpha$  (siehe Abb. 5.6). Dies deckt sich mit der Erwartungshaltung eines dominanten Einflusses biochemischer Prozesse auf die Zeitskala der Zellteilungen. Aus den durch die Segmentierung der Membranaufnahmen ermittelten Größen der einzelnen Zellen kann zudem das Asymmetrieverhältnis einer Zelle bei ihrer Zellteilung aus dem Ver-



**Abb. 5.5: Volumenabhängigkeit der Zellzyklendauern**

(A) Gezeigt sind die experimentell gemessenen Zellzyklendauern der somatischen *AB*-Linie und der Zellen der Keimbahnlinie  $P_{1-4}$  für eine Umgebungstemperatur von 22,5°C in unbehandelten Embryonen. Die Dauer der Interphase verhält sich invers proportional zum Zellvolumen, was im Rahmen eines *limiting-component*-Modell erklärt werden kann. (B) Die theoretisch erwarteten Zellzyklendauern  $T_{\text{Modell}}$  nach Gl. 5.1 decken sich für die unterschiedlichen Zelllinien mit den experimentell gemessenen Werten. Zusätzliche Aufnahmen an RNAi-behandelten Würmern (siehe Kasten rechts unten, Längenskala 10  $\mu\text{m}$ ) führen zu systematisch verringerten (sm) oder vergrößerten (la) Zellvolumina und bestätigen das theoretische Modell auch für eine Größenvariation des gesamten Embryos. *Abbildungen nach [17]*

hältnis der beiden Volumina der jeweiligen Tochterzellen bestimmt werden [145]. Hierbei zeigt sich eine klare Asymmetrie für die Zellen der zukünftigen Keimbahn mit einer ansteigenden Asymmetrie für spätere Zellen. Auch die Zellen der somatischen Zelllinien weisen bisweilen ein asymmetrisches Volumenverhältnis auf. Messungen nach einer Entfernung der starren Chitinhülle zeigen eine Reduktion der vorhandenen Asymmetrien in den somatischen Zelllinien, was für eine Asymmetrie der Zellteilungen aufgrund geometrischer Randbedingungen spricht. Die asymmetrischen Zellteilungen der Keimlinie sind zurückzuführen auf eine nur dort auftretende, zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung und sind nahezu unabhängig von der Einschränkung der Eihülle [145]. Simulationen der Zelltrajektorien und -anordnungen nach dem in Unterkap. 5.2 beschriebenen Modell geben den experimentell gemessenen Zustand wieder, solange die



**Abb. 5.6: Zellzyklendauern in Abhängigkeit von Temperatur und Zellvolumen**

Gezeigt sind die experimentell gemessenen Zellzyklendauern der somatische *AB*-Linie und der Zellen der Keimbahn  $P_{1-4}$  bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen im Bereich von 15–25°C. Die Temperaturabhängigkeit der Zellphasendauern lässt sich gemäß einer Arrhenius-Skalierung beschreiben [17]. *Abbildungen nach Herrn Rolf Fickentscher*

Werte der Asymmetrien bei den Zellteilungen und die Werte für  $\alpha_{\text{Keimlinie}}$ ,  $\alpha_{\text{Somatisch}}$  und  $T_M$  im Bereich der gemessenen Werte liegen. Wird jedoch z.B.  $\alpha_{\text{Keimlinie}} = \alpha_{\text{Somatisch}}$  gesetzt ohne Berücksichtigung der asymmetrischen Teilungsverhältnisse, kommt es ab dem 12-Zellzustand in ungefähr 25% der Simulationen zum Auftreten aberranter Phänotypen mit einer veränderten Zellanordnung. Dies ist begründet in einer zu schnellen Teilung der Zellen der Keimlinie, wodurch die Positionen einiger Zellen im Embryo vom gemessenen Wildtypen abweichen [17].

#### 5.4. Zusammenfassung und Ausblick

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Weiterentwicklungen des SPIM-Aufbaus ist es gelungen, dreidimensionale Langzeitmessungen am frühen Embryo des *C. elegans* durchzuführen, welche zu den obig beschriebenen Ergebnissen führten. Die hohe zeitliche und räumliche Auflösung bei gleichzeitiger Schonung der Probe, sowie die Möglichkeit, Mehrkanalmessungen zu tätigen, ergab neue Möglichkeiten bei der Auswertung relevanter Charakteristiken der Embryonalentwicklung. Für weitere Details der Datenauswertung und eine weiterführende Ergebnisdiskussion sei hier auf [16, 17, 145] verwiesen. Die aus den obigen Messungen resultierenden Ergebnisse sind im Nachfolgenden nochmals als Übersicht gelistet:

- sowohl Zellanordnungen als auch Zelltrajektorien sind während der frühen Embryogenese für unterschiedliche Individuen nahezu identisch
- Zelltrajektorien während der frühen Embryogenese können mit einem mechanischen Modell beschrieben werden, innerhalb dessen die einzelnen Zellen als verformbare Sphäroide repulsive Kräfte voneinander und durch die Eihülle erfahren - auf dem Modell basierende Simulationen reproduzieren die Messdaten
- die Dauer der Interphase ist invers proportional zu den Zellvolumina und können mit einem *limiting-component*-Modell beschrieben werden - hierbei existiert ein zelllinienspezifischer Unterschied der Skalierung zwischen der somatischen Linie und der Keimlinie
- die Zeitskalen der Zellteilungen zeigen eine temperaturabhängige Arrhenius-Skalierung
- asymmetrische Teilungen der Keimlinie sind zurückzuführen auf eine zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung
- Asymmetrien in Zellteilungen der somatischen Linien werden vorwiegend durch die Wechselwirkung mit der einhüllenden Eihülle verursacht
- asymmetrische Zellteilungen und zelllinienspezifische Skalierungsunterschiede sind notwendig für eine robuste Reproduktion des Wildtyp-Phänotypen in den auf dem mechanischen Modell basierenden Simulationen - andernfalls entsteht eine Bifurkation der Simulationen hin zu einem aberranten Phänotypen
- die Eihülle ist im Rahmen der Simulation notwendig zur robusten Embryogenese - bei fehlender Eihülle ist das Auftreten von aberranten Phänotypen möglich

Unter den zukünftigen Zielen dieses Projekts befindet sich unter anderem die Frage nach dem Verhalten der Zellanordnung und Teilungszeitcharakteristik zu späteren Entwicklungsstadien (100 Zellen und mehr). Hierbei stellt neben der bei der Untersuchung immer kleiner werdender Zellen limitierenden Auflösung insbesondere ein verschlechtertes Signal-Rausch-Verhältnis zu späteren Zeitpunkten ein Problem bei der Datenauswertung dar. Dies scheint vornehmlich durch die stärkere Streuung und Absorption des anregenden Lichtblatts sowie der angeregten

Fluoreszenz in der heterogenen Umgebung der späteren Embryonen induziert zu sein. Ein Einsatz einer konfokalen Schlitzauslesung in Zusammenhang mit einem geschriebenen Lichtblatt [73, 77] sollte hierbei zu einer Steigerung des Kontrastes der Aufnahmen führen und soll in der näheren Zukunft am Aufbau implementiert werden.

Eine Überprüfung des hier beschriebenen Modells der Zellanordnung für veränderte Randbedingung, wie verlängerter Zellzyklendauern oder ausbleibender Zellteilungen kann über die Durchführung von Ablationsexperimenten im lebenden Embryo realisiert werden. Erste erfolgreiche Realisierungen solcher Experimente werden in Unterkap. 9.3 vorgestellt.

## 6. Techniken zur Diffusionsmessung in einem Lichtblattmikroskop

*Dieses Kapitel behandelt den Einsatz des SPIM-Aufbaus zur Durchführung quantitativer Diffusionsmessungen. Hierfür werden die zuvor in Unterkap. 3.2 vorgestellten Methoden SPIM-FCS, SPT und DDM am Aufbau angewandt und durch Messungen an Eichproben getestet. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Techniken werden abschließend im Hinblick auf den Einsatz in biophysikalischen Fragestellungen verglichen. Die Implementierung, Messungen und die Evaluation der Daten wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt.*

### Zielsetzung und Motivation

Die Quantifizierung des Diffusionsverhaltens von Partikeln und Molekülen kann Aufschluss über innere Prozesse in biologischen Proben geben. Da die heterogene Umgebung lebender Materie bisweilen räumliche Variationen der Diffusion zeigt [33, 36, 103, 147], kann dies räumlich parallelisierte Diffusionsmessungen in einem ausgedehntem Bereich der Probe erforderlich machen. Darüber hinaus ist insbesondere bei fluoreszenzmikroskopischen Techniken darauf zu achten, die Probe durch die Messung und z.B. mögliche phototoxische Effekte nicht zu beeinträchtigen oder in ihrem natürlichem Verhalten zu beeinflussen. In diesem Kapitel erfolgt die Implementierung unterschiedlicher Techniken zur quantitativen Diffusionsmessung am zuvor vorgestellten SPIM-Aufbau. Durch die Verwendung eines Lichtblattmikroskops wird der Photostress auf den Organismus minimiert. Zudem wird durch die Auswertung von Bilddaten zur Diffusionsmessung in einer ausgedehnten Region der Probe die Quantifizierung des diffusiven Verhaltens, je nach verwendeter Methode, an unterschiedlichen Probenstellen (FCS), für unterschiedliche Partikel (SPT) oder über einen Bereich an Wellenvektoren (DDM) ermöglicht. In diesem Kapitel werden die technischen Details der Implementierungen, der Messaufnahmen und der Datenevaluation anhand von Eichmessungen an Kalibrationsproben vorgestellt.

### 6.1. SPIM-FCS

#### Implementierung, allgemeine Versuchsdurchführung und Datenevaluation

Zur Durchführung einer *Imaging*-FCS-Messung ist es zunächst erforderlich, das Observationsvolumen klein zu halten. Dies wird in lateraler Auflösung durch die Verwendung eines Detektionsobjektivs mit hoher numerischer Apertur ( $NA = 0,8$ ) und hoher Vergrößerung ( $40\times$ ) sowie durch die Wahl eines Kamerasensor mit hinreichend kleinen Pixelabmessungen in der Bildebene ( $162,5\text{nm}$ ) erreicht. In axialer Ausdehnung ist die Begrenzung des Observationsvolumens durch die Kombination der Detektions-PSF der Optik (Numerische Apertur) und der Dicke des Lichtblatts bestimmt (siehe Gl. 3.9). Durch die Wahl eines dünnen Lichtblatts ( $\sigma_{\text{Lichtblatt}} \leq 1,2\mu\text{m}$ ) kann so die Größe des Observationsvolumens mit ca.  $1,2\text{fl}$  gering genug für FCS-Messungen gehalten werden.

Für SPIM-FCS-Messungen wird über eine Zylinderlinse ein statisches Lichtblatt erzeugt, da für ein geschriebenes Lichtblatt in einem DSLM-Ansatz zum einen ein Einfluss auf die Autokorrelation der Bildintensitäten aufgrund der Frequenz des Schreibvorgangs zu erwarten ist und zum anderen der mögliche Frequenzbereich der Ansteuerung des verwendeten Galvospiegelpaares zu gering wäre, um die für die Auswertung der Korrelation notwendigen hohen Bildaufnahmezeiten bei gleichmäßiger Ausleuchtung zu gewährleisten.

Die eigentliche Messung besteht aus der konsekutiven Bildaufnahme der Probenebene, in der die fluoreszenzmarkierten Partikel angeregt werden und deren Fluoreszenzsignal pixelweise über einen ausgedehnten Zeitbereich detektiert wird. Nach der SPIM-FCS-Messung wird bei gleichen Aufnahmeparametern, jedoch ohne Fluoreszenzanregung, eine reduzierte Anzahl an Bild-



aufnahmen zur Bestimmung des Kamerahintergrunds getätigt (in dieser Arbeit üblicherweise im Bereich von 2000 konsekutiven Einzelaufnahmen).

Abhängig von der erwarteten Zeitskala der Teilchenbewegung und der Intensität des Fluoreszenzsignals wird die Belichtungszeit und damit auch die Bildaufnahmezeit der Messung angepasst. Nach [148] sollte letztere für eine erwartete Diffusionszeit  $\tau_D$  bei kamerabasierten FCS-Messungen mindestens  $(0,1 \cdot \tau_D)^{-1}$  betragen, um den Fehler der Messungen kleiner 10% zu halten. Die Möglichkeit des Pixel-Binnings, also der Zusammenlegung mehrerer benachbarter Pixel zu einem größeren effektivem Pixel, kann bei zu niedriger Signalstärke oder zu schneller Diffusion hilfreich sein. Eine so resultierende Vergrößerung des effektiven Observationsvolumens führt zudem zu einer Verschiebung von  $\tau_D$  zu größeren Zeiten hin, was den Fit-Vorgang an den aus den Messdaten berechneten Autokorrelationskurven stabiler werden lässt. Dies führt jedoch auch zu einem Verlust der räumlichen Auflösung und zu einer Erhöhung der Teilchenanzahl im Observationsvolumen.

Ein weiterer Vorteil einer so wählbaren Größe der lateralen Observationsfläche ist die Durchführung von Messungen des diffusiven Verhaltens auf verschiedenen Längenskalen, was z.B. zur Untersuchung von komplexen Membranstrukturen verwendet werden kann [149, 150]. Hierbei können anhand längenskalenabhängiger Änderungen der Diffusionszeiten über das *FCS-Diffusion-Law* [149] von brownischer Bewegung abweichende Diffusionsarten, z.B. auf Netzwerken oder innerhalb von Mikrodomänen, unterschieden werden. Das Binning kann hierbei sowohl während der Messung auf dem Kamerasensor ausgeführt werden (*on-chip*-Binning), als auch erst nach der Messung artifiziell in der Auswertung der Pixeldaten.

Die Aufnahmedauer einer SPIM-FCS-Aufnahme sollte möglichst lange sein, um mittels einer Mittelung über die korrelierten Zeitabstände zu robusten Daten zu kommen (nach [148] minimal  $\geq \max(100 \cdot \tau_D, 10000 \cdot \tau)$  für einen Fehler unter 20%). Die Länge einer Aufnahme kann jedoch insbesondere bei einer großen Pixelanzahl der Bilder durch die reine Größe der erzeugten Daten begrenzt sein. Bei *in vivo*-Messungen an biologischen Proben können zudem phototoxische Effekte im Organismus limitierend für die Aufnahmedauer sein. Auch ist im besonderen Fall sich entwickelnder Proben auf die Zeitskala der Entwicklung der Probe zu achten. Dies kann dazu führen, dass es bei Messungen innerhalb bestimmter Entwicklungsstadien eines Organismus notwendig ist, die Messdauer auf ein Zeitfenster innerhalb des untersuchten Stadiums zu begrenzen.

Aufgrund der tendenziell niedrigeren Signalstärke bzw. eines schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses bei Kameraaufnahmen mit sehr kurzen Belichtungszeiten, kann es notwendig sein, dies durch höhere Anregungsleistungen in der Beleuchtung zu kompensieren. Hierbei ist wie bereits erwähnt auf Phototoxizität aber auch auf Bleichprozesse zu achten. Während die mittlere Intensität in einer idealen SPIM-FCS-Messung keinen Abfall über die Zeit aufweist, ist es möglich im Experiment dennoch auftretendes Bleichen durch eine entsprechende Korrektur zu kompensieren. Hierbei wurde im Rahmen dieser Arbeit Bleichprozesse der nachfolgenden empirischen Form berücksichtigt:

$$f(t) = f_0 e^{-a_0 t + \sum_{i=1}^n a_i t^{1+i}} \quad (6.1)$$

Das hintergrundkorrigierte Fluoreszenzsignal  $f(t)$  fällt hierbei von der ursprünglichen Intensität  $f_0$  exponentiell ab mit einem Polynom  $n$ -ter Ordnung im Exponenten. Die Funktion  $f(t)$  wird pixelweise berechnet und nach [97] über

$$I_{\text{kor}}(t) = \frac{I(t)}{\sqrt{\frac{f(t)}{f(0)}}} + f(0) \cdot \left(1 - \sqrt{\frac{f(t)}{f(0)}}\right) \quad (6.2)$$

mit der hintergrundkorrigierten gemessenen Fluoreszenzintensität  $I(t)$  verrechnet um das letztendlich korrigierte Signal  $I_{\text{kor}}(t)$  zu ermitteln. Diese Art der Bleichkorrektur hat keinen Einfluss

auf die so ermittelten Diffusionszeiten, solange die Bleichprozesse auf entsprechend längeren Zeitskalen im Vergleich zur Dynamik der Diffusion ablaufen [38, 108].

Zur Auswertung der Datensätze wird das *Open-Source-Software Quickfit 3.0* (Version 3.0 (beta) 64-bit, SVN: 4465, Kompilierdatum: 2015-10-29) [38, 142] in einem *Windows 10 64bit*-Betriebssystem verwendet. Innerhalb der Software sind alle notwendigen Schritte zum Einlesen der Daten, der Bleichkorrektur, der Erstellung der Autokorrelation und eine Fit-Routine zur Datenevaluation enthalten. Die Fit-Ergebnisse werden zur weiteren Datenverarbeitung in *Matlab* eingelesen und können über eigene Skripte weiterverarbeitet werden. Vor dem Erstellen der Autokorrelation werden die Messaufnahmen zunächst eingelesen und der Kamerahintergrund wird anhand der vorhergehend aufgenommenen Hintergrundaufnahme gemittelt und abgezogen. Bei Bedarf wird eine reduzierte ROI der Aufnahmen ausgewählt und anhand der gemittelten Intensitätskurve aller später verwendeten Pixel der Aufnahmen nach Intensitätsspitzen (zum Beispiel aufgrund von vereinzelt Agglomeraten in der Probe) gesucht. Bei Bedarf können so durch die Auswahl eines reduzierten, konsekutiven Zeitfensters diese aus der Evaluation ausgenommen werden. Zudem zeigt die gemittelte Intensitätskurve auch potentiell auftretende Bleichvorgänge, die bei Bedarf im weiteren Verlauf über eine Auswahl des passenden Bleichmodells  $f(t)$  berücksichtigt werden können. Ebenso ist es möglich ein zusätzliches Software-Binning auf die Aufnahmen anzuwenden.

Nach der Einstellung oben genannter Parameter erfolgen die notwendigen Operationen mit dem Endresultat einer Autokorrelationskurve für jeden resultierenden Pixel der Auswertung. Bei inhomogenen Proben, wie etwa bei Embryonen mit spezifisch markierten Zellorganellen, kann in einem nächsten Schritt eine Maskierung von Pixeln außerhalb der zu untersuchenden Strukturen erfolgen. Ebenso können zum Beispiel Stellen mit Agglomeraten örtlich maskiert werden.

Zur Auswertung der Autokorrelationskurven, steht eine Fit-Umgebung zur Verfügung, innerhalb derer eine passende Fit-Funktion (z.B. nach Gl. 3.29 oder Gl. 3.35), der verwendete Fit-Algorithmus (innerhalb dieser Arbeit: *Levenberg-Marquardt*) und diverse Übergabeparameter ausgewählt werden können. Die Übergabeparameter bestehen hierbei zum einen aus aufbauspezifischen Größen wie der lateralen und axialen Auflösung sowie der Pixelgröße und zum anderen aus Start- und Rand-Werten für offene Fit-Parameter, wie dem erwarteten Diffusionskoeffizienten, Teilchenanzahl und Fraktionsanteilen bei mehrkomponentigen Fit-Modellen.

Nach Beendigung der Fit-Prozedur lassen sich die Ergebnisse als zweidimensionale Abbildung der pixelweise aufgetragenen Fit-Ergebnisse darstellen. Hierdurch lassen sich letztendlich Diffusionskarten der aufgenommenen Probenebene erstellen. Vermeintliche Ausreißer zu sehr hohen oder niedrigen Diffusionskoeffizienten bezüglich des Mittelwertes lassen sich so schnell bezüglich eines stabilen Fits nachprüfen und der Fit bei Bedarf wiederholen. Ist dies z.B. aufgrund einer stark verzerrten Autokorrelationskurve nicht möglich, werden die betroffenen Pixel oder Regionen bei Bedarf entsprechend maskiert.

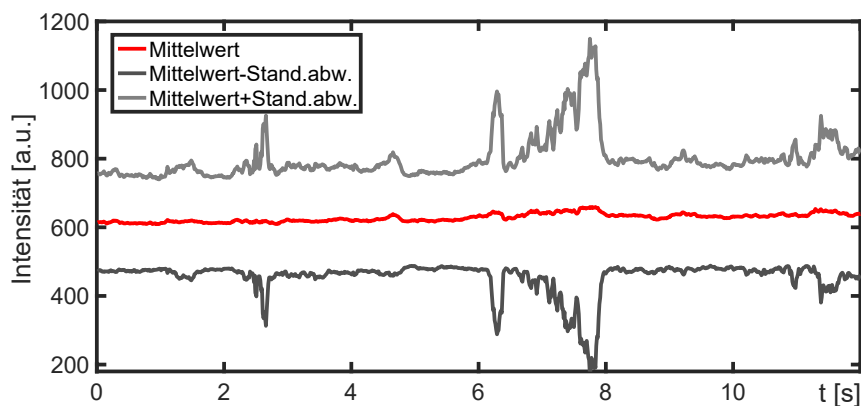
Nachfolgend sind die einzelnen Schritte der Datenaufnahme und Auswertung nochmals stichpunktartig aufgelistet:

- Messung über konsekutive Bildaufnahme bei möglichst hoher Bildaufnahmezeitrate, möglichst langer Messdauer und möglichst niedriger Anregungsleistung
- Messung des Kamerahintergrunds bei fehlender Anregung
- Einlesen der Daten in *Quickfit*:  
Abzug des gemittelten Hintergrunds - ROI-Auswahl - Auswahl des Zeitfensters anhand der gemittelten zeitlichen Intensitätskurve (z.B. bei Intensitätsspitzen) - optionales Software-Binning - Bleichkorrektur - Berechnung der Autokorrelation (optional für mehrere Binning-Stufen)

- Maskierung von Pixeln (z.B. bezüglich bestimmter Zellkompartimente oder Agglomerate)
- Fit-Prozedur der Daten mit geeignetem Modell der Diffusion
- Nachkontrolle der Fit-Ergebnisse (z.B. anhand der Diffusionskarte)
- Weiterverarbeitung der Datensätze in *Matlab*

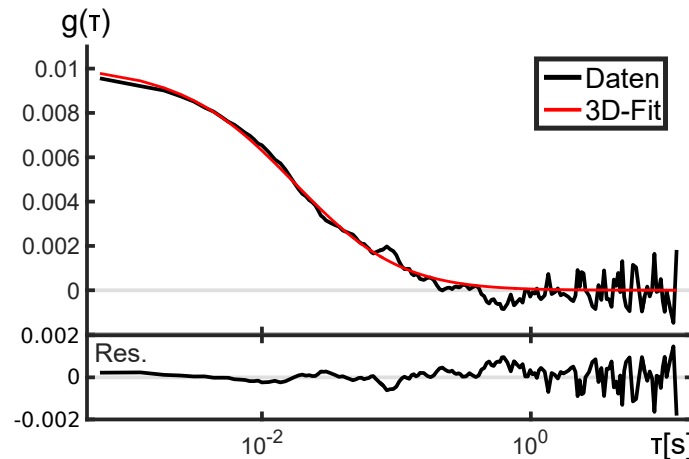
### Messungen an Kalibrationsproben: Beads

Zur Validierung der verwendeten SPIM-FCS-Methode am Aufbau werden in einem ersten Schritt quantitative Diffusionsmessungen an Kalibrationsproben vorgenommen. Hierfür werden zunächst die bereits zuvor in dieser Arbeit verwendeten Beads (*FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres 0.2µm*, Invitrogen) in wässriger Lösung gemessen. Ihre runde Geometrie mit einem Durchmesser von 200nm führt nach Gl. 2.6 zu einem theoretisch erwartetem Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{theo}} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  in wässriger Lösung bei  $T = 20^\circ\text{C}$ . Für eine Messung im SPIM-Aufbau wird die Beads-Stammlösung mit einem ursprünglichen Feststoffgehalt von 2% zunächst mittels Milli-Q-Wasser auf eine Verdünnung im Bereich 0,002 – 0,04 % gebracht. Die Lösung wird in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt und für mindestens 15min in ein Ultraschallbad gelegt, um mögliche Agglomerate aufzulösen. Die Proben werden danach beliebig lange im Kühlschrank bei 5°C unter Lichtausschluss aufbewahrt und vor einer Messung erneut ins Ultraschallbad gegeben. Für die eigentliche Messung werden 500 – 700µl der Probe auf ein mit Alkohol gereinigtes rundes Deckgläschen ( $\varnothing = 20\text{mm}$ ) aufpipettiert, so dass der Tropfen groß genug ist, um sowohl die Glasfläche des Anregungs-, als auch des Detektionsobjektivs vollständig zu benetzen. Diese Methode wurde bereits erfolgreich in SPIM-FCS Messungen in vergleichbaren Aufbauten verwendet [101]. Hierbei ist darauf zu achten, an einer Probenstelle nahe am Boden des Deckgläschens zu messen, da in der Mitte der Probe stärkere Konvektionsströmungen auftreten können [101], was bereits während einer Live-Aufnahme der Probe



**Abb. 6.1: Beispiel eines Intensitätsverlaufs einer Bead-Aufnahme**

Gezeigt ist der zeitabhängige Mittelwert (rote Kurve) aller Pixelintensitäten einer Langzeitaufnahme diffundierender Beads, sowie die Werte des Mittelwert abzüglich (dunkelgrau) und zuzüglich (hellgrau) der Standardabweichung. Zu erkennen ist ein um ein konstantes Niveau fluktuierender Mittelwert mit einzelnen Ausreißern hin zu erhöhten Intensitäten bzw. größeren Standardabweichungen. Diese Ereignisse sind auf Agglomerate mit erhöhtem Signal zurückzuführen, die in die aufgenommene Probenebene hinein diffundieren und diese nach kurzer Zeit wieder verlassen. In einer SPIM-FCS-Auswertung können diese Ereignisse entweder zeitlich ausgenommen werden oder die betroffenen Pixel in der Probenebene maskiert werden. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe 124 × 124 Pixel*)



**Abb. 6.2: Beispiel einer Autokorrelationskurve einer Beads-Messung**

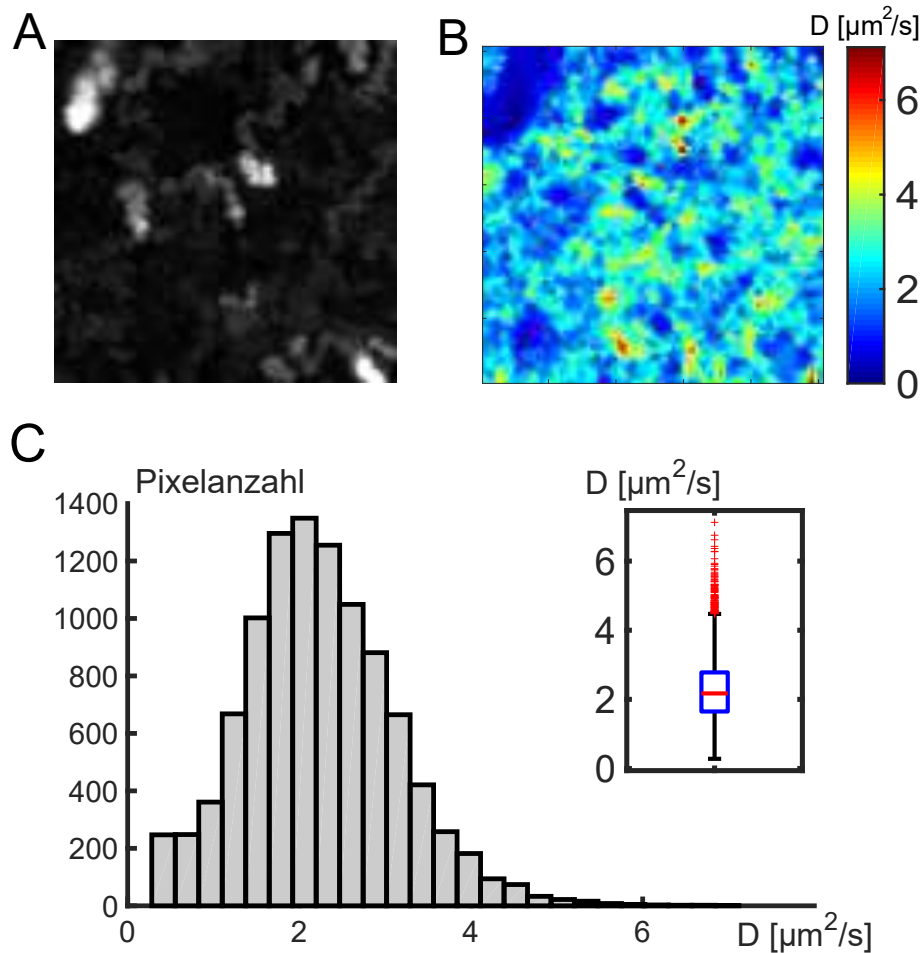
Gezeigt ist eine exemplarische Autokorrelationskurve eines Pixels (schwarz) einer Beads-Messung mit einem Fit (rot) basierend auf normaler dreidimensionaler Diffusion nach Gl. 3.29 mit den zugehörigen Residuen. Die Zeitauflösung ist bezüglich des Abfalls der Autokorrelation ausreichend für einen verlässlichen Fit der Daten an das verwendete Diffusionsmodell. Die Residuen zeigen keine auffälligen Abweichungen vom verwendeten Fit-Modell. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm*)

und in der späteren Auswertung des Diffusionsverhaltens sichtbar wird. Die Verwendung einer größeren Probenmenge, um so die komplette Probenkammer mit der Beads-Lösung zu füllen, würde ein Volumen von ca. 30 – 50ml benötigen und eine entsprechende Reinigung aller beteiligter Komponenten nach der Messung nötig machen. Eine andere Möglichkeit der Probenpräparation zur Vermessung geringerer Probenmengen in einem Lichtblattmikroskop, die Strömungen erfolgreich beseitigen kann, ist die Verwendung von Probensäckchen bzw. -röhren, die aus einem Material bestehen, dessen Brechungsindex nahezu identisch zu dem von Wasser ist [38, 107]. Da sich dies aufgrund der Aufbaugeometrie in einem vertikalen Aufbau als schwierig gestaltet, wurde unter anderem zur Implementierung dieser Art der Probenpräparation der zweite, horizontale SPIM-Aufbau entwickelt, gebaut und bereits erfolgreich mit dieser Art der Probenpräparation eingesetzt [137]. Die in dieser Arbeit verwendeten Bildaufnahmeparameter für eine Messung an Bead-Lösungen sind wie folgt:

- Laserleistung (491nm): 50mW
- AOTF (491nm): 0,5 – 5V (Leistung an hinterer Objektiv-Apertur: 0,2 – 15mW )
- 20.000 Einzelaufnahmen + 2.000 Hintergrundaufnahmen
- Kamerabelichtungszeit: 624 – 1208μs
- Binning (on-chip): 1 × 1
- ROI: (124 × 124) – (248 × 248) Pixel
- Lichtblattdicke: 1,2μm

Nach der Messung wird zunächst der zeitliche Verlauf der gemittelten Intensitätskurve aller Pixel in der Aufnahme betrachtet. Dieser lässt Rückschlüsse auf die Qualität der Aufnahme bzw. auf die Gegenwart einzelner Agglomerate zu, die in der Messung als Intensitätsspitzen zu erkennen sind (siehe Abb. 6.1). Zur Steigerung der Datenqualität kann man die Aufnahme zeitlich auf

einen Verlauf ohne diese Ereignisse zuschneiden, wodurch jedoch die Länge der Aufnahme an sich reduziert wird. Eine weitere Möglichkeit ist die lokale Maskierung der Pixel anhand ihrer Intensitätswerte. Die Autokorrelationskurven aus den Intensitätskurven der einzelnen Pixel werden mit einem entsprechenden Modell dreidimensionaler Diffusion nach Gl. 3.29 gefittet, um den Diffusionskoeffizienten zu bestimmen (siehe rote Kurve in Abb. 6.2).



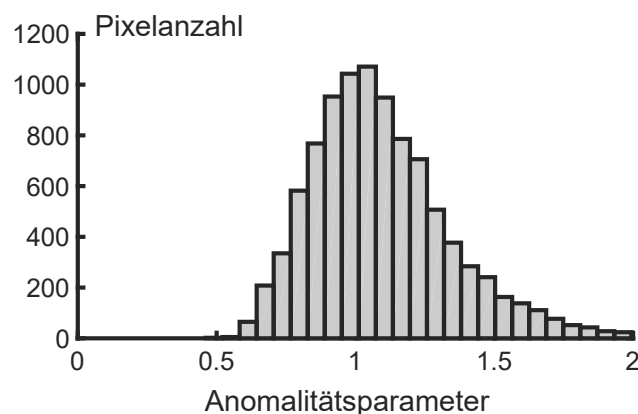
**Abb. 6.3: Maximalintensitätsprojektion, Diffusionskarte und Statistik einer Beads-Messung**

(A) Die Maximalintensitätsprojektion einer Beads-Aufnahme zeigt deutliche Agglomerate (z.B. im oberen linken Bildausschnitt), die sich in der Diffusionskarte wiederfinden als Orte deutlich erniedrigter Diffusionskoeffizienten. (B) Die Diffusionskarte der Messung zeigt eine Verteilung von gemessenen Diffusionskoeffizienten im Bereich von  $0,1 - 6,5 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einem Maximum der Verteilung bei ca.  $2,1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . (C) Die Statistik der gemessenen Diffusionskoeffizienten (unter Maskierung der Agglomerate) zeigt eine Verteilung um einen Mittelwert von  $(2,24 \pm 0,88) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Medianwert:  $2,17 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung. In der zugehörigen Darstellung als Boxplot mit rotem Medianwert, oberem und unterem Quartil und einer Whiskerlänge gemäß des 1,5-fachen Interquartilsabstands werden ca. 1% der gemessenen Werte als Ausreißer zu höheren Diffusionskoeffizienten ( $> 4,48 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) dargestellt. Mittel- und Medianwert der Verteilung liegen im Bereich des für diese Partikelgröße erwarteten Diffusionskoeffizienten von  $2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

Die so erhaltenen Diffusionskoeffizienten können so pixelweise als Diffusionskarte angezeigt und die Statistik in Form einer Verteilung betrachtet werden (siehe Abb. 6.3 B und C). Innerhalb der Intensitätsdarstellung und der Diffusionskarten (Abb. 6.3 A und B) können so auffällige Bereiche betrachtet und auf potentielle Abweichungen der Daten oder der Fit-Qualität untersucht werden.

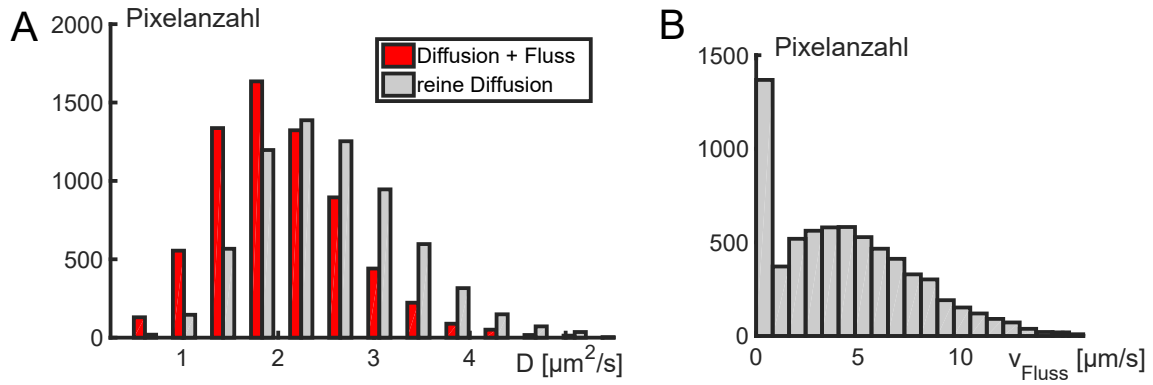
Die Ergebnisse der in Abb. 6.3 dargestellten Messung zeigen neben der aus dem Intensitätsverlauf in Abb. 6.1 zu erwartenden Präsenz von Agglomeraten eine Verteilung der gemessenen Diffusionskoeffizienten um einen Mittelwert von  $(2,24 \pm 0,88) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung, was sich mit dem theoretisch erwarteten Wert von  $2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  deckt. Hierbei sind gemessene Diffusionskoeffizienten bei niedrigeren Werten mit nicht maskierten Agglomeraten in der Messung erklärbar. Gemessene Werte bei höheren Werten sind auf mögliche Ungenauigkeiten des Fit-Algorithmus bzw. der Auswerteroutine zurückzuführen. Die gemessene Verteilung und insbesondere die Größe der Standardabweichung ist vergleichbar mit SPIM-FCS-Messungen anderer Gruppen an vergleichbaren Proben [106].

Um den Verlauf der Autokorrelation auf eine eventuelle Anomalie der Diffusion zu überprüfen, zum Beispiel aufgrund eines vorliegenden Strömung in der Probe, welche einen Anomalieparameter  $\alpha > 1$  zur Folge hätte, kann ein entsprechend modifiziertes Modell der anomalen Diffusion an die Daten gefittet werden (siehe Unterkap. 3.2.1). Eine exemplarische Verteilung der so erhaltenen Anomalieparameter  $\alpha$  in Abb. 6.4 zeigt einen leicht erhöhten Mittelwert der Verteilung mit  $\alpha = 1,10 \pm 0,25$ . Im Rahmen der Standardabweichung zeigt diese Messung so eine großteils normale Diffusion. Um die Daten gezielt auf einen gerichteten Fluss hin zu überprüfen, lässt sich ein entsprechendes Fit-Modell nach [38, 100, 142] verwenden, welches eine gerichtete Strömung in der Form der Autokorrelationsfunktion mit einbezieht. Die Ergebnisse einer derartigen Auswertung auf die gemessenen Flussgrößen und Diffusionskoeffizienten für eine Beads-Messung mit vorliegender Strömung sind in Abb. 6.5 gezeigt.



**Abb. 6.4: Anomalieparameter  $\alpha$  für eine Beads-Messung**

Um die Diffusion der Beads auf eine mögliche Anomalie hin zu untersuchen, kann die Verwendung eines Fit-Modells basierend auf anomaler Diffusion verwendet werden. Dies liefert für die hier gezeigte Messung eine Verteilung an gemessenen Anomalieparametern um einen Mittelwert von  $\alpha = 1,10 \pm 0,25$  (Medianwert 1,07). Der leicht zur Superdiffusion erhöhte Mittel- bzw. Medianwert deutet auf einen vorliegenden Fluss hin, der zu einem beschleunigten Abfall der Autokorrelationskurven führt. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel*)



**Abb. 6.5: Flussgeschwindigkeiten und Diffusionskoeffizienten für eine Beads-Messung mit vorliegender Strömung**

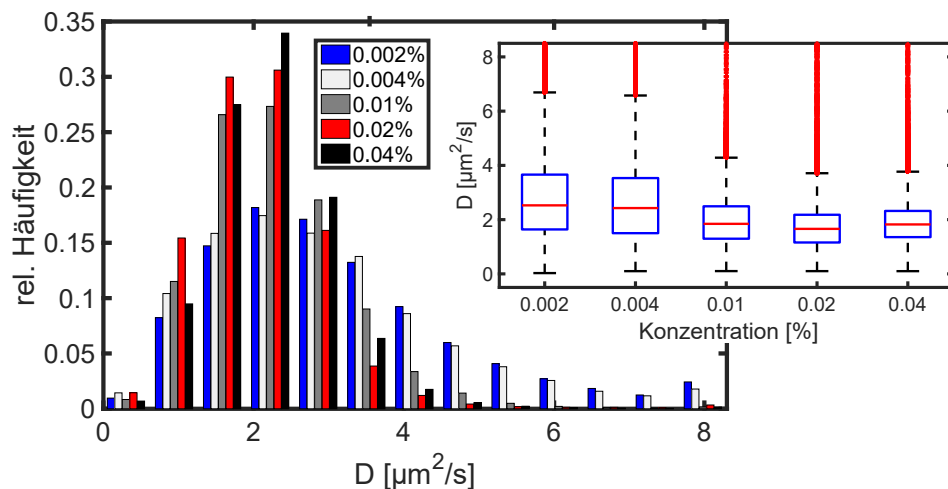
(A) Die Verteilung der gemessenen Diffusionskoeffizienten unter Berücksichtigung einer Strömung führt bei der Verwendung an einem Datensatz mit ausgeprägtem Fluss zu einer entsprechenden Reduktion der gemessenen Werte. Während unter der Annahme einer reinen Diffusion ein Mittelwert von  $2,55 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Medianwert:  $2,45 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) mit einer Standardabweichung von  $0,81 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  gemessen wird, ergibt sich aus einem Fit mit Fluss ein Mittelwert von  $2,04 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Medianwert:  $1,96 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) mit einer Standardabweichung von  $0,72 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . (B) Die Verteilung der durch das Fit-Modell ermittelten Strömungsgeschwindigkeit  $v_{\text{Fluss}}$  besitzt ein deutliches Maximum bei  $0 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ , was bedeutet, dass für einen gewissen Teil der Pixel kein Fluss in der Autokorrelation über den Fit bestimmt werden konnte. Für die restlichen Pixel ergibt sich eine Verteilung an Flussgeschwindigkeiten mit einem Mittelwert von  $4,35 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  (Medianwert:  $3,99 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ ) mit einer Standardabweichung von  $3,48 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel*)

Da die Autokorrelation eines einzelnen Pixels für die Richtung einer Strömung blind ist, würde zur Bestimmung derselben eine Kreuzkorrelation zwischen benachbarten Pixeln verwendet werden müssen [38, 107], worauf im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wird. Bei Aufnahmen mit sichtbar vorliegender Strömung führt die Verwendung des flusskorrigierten Modells zu einer dementsprechenden Erniedrigung des aus dem Fit bestimmten Diffusionskoeffizienten im Vergleich zur Verwendung einer Fit-Funktion ohne Fluss, da der Abfall der Autokorrelation in diesen Fällen durch die gerichtete Strömung beschleunigt wird.

Nach den entsprechenden Korrekturen ergibt sich für SPIM-FCS-Messungen an 200nm-Beads mit einer Konzentration von 0,04% ein aus sechs Messungen bestimmter Diffusionskoeffizient von  $(1,89 \pm 0,83) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Mittelwert mit Standardabweichung über alle Pixel aus allen Messungen). Der so experimentell bestimmte Wert deckt sich im Rahmen der Fehler mit der theoretischen Erwartung von  $2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Der im Vergleich zum theoretisch erwarteten Wert leicht erniedrigte Mittelwert der Messungen könnte hierbei durch nicht identifizierte Agglomerate in den Messungen erklärt werden. Der Versuch eines zweikomponentigen Fits zur Evaluierung der Agglomeratbildung im Szenario einer normalen Diffusion bzw. Diffusion mit Fluss blieb ohne zufriedenstellende Ergebnisse, was mit dem geringen zu erwartendem Unterschied der Diffusionskoeffizienten zwischen einzelnen Beads und den Agglomeraten aus zwei oder mehr Beads erklärbar ist. SPIM-FCS-Messungen anderer Gruppen an vergleichbaren Proben liefern Werte von  $(1,9 \pm 0,7) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  [106].

### Messungen für unterschiedliche Bead-Konzentrationen

Um die Ergebnisse der SPIM-FCS-Messungen für unterschiedliche Konzentrationen von Bead-Lösungen zu testen, wurden 15 unabhängige Messungen mit je minimal  $124 \times 124$  Pixeln für Konzentrationsbereiche von 0,002 – 0,04 % durchgeführt und nach der oben beschriebenen Prozedur ausgewertet (je drei Messungen mit Zeitabständen von  $1208\mu\text{s}$  für alle Konzentrationen und je drei zusätzliche Messungen mit Zeitabständen von  $624\mu\text{s}$  für 0,002% und 0,04%). Die Ergebnisse der Verteilungen aller nicht maskierten Pixel dieser Messungen sind in Abb. 6.6 bzw. Tab. 3 gezeigt. Hierbei fällt auf, dass bei Messungen an niedrigeren Konzentrationen die Verteilungen der gemessenen Diffusionskoeffizienten bei höheren Werten wesentlich höhere Häufigkeiten aufweisen, während die Maxima der Verteilungen für alle Konzentrationen im Bereich von  $2,0 - 2,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  verbleiben. Diese Beobachtung bei niedrigen Konzentrationen wird begleitet von einer erhöhten Anzahl an Pixeln in den einzelnen Messungen, die aufgrund einer unzureichenden Qualität der Autokorrelationskurve maskiert werden müssen. Dies ist insbesondere an Orten in der Probenaufnahme der Fall, an denen während der Messung bei niedrigeren Konzentrationen innerhalb der endlichen Messzeit von 12,5 – 24,2s eine unzureichende Anzahl an Teilchen das Observationsvolumen passiert haben, was in den gemittelten Intensitäten der Zeitaufnahme sichtbar ist. Eine Maskierung der Pixelwerte mit Mittelwerten der Intensitätswerte in den unteren 10% der Intensitätsverteilung führte hierbei zu einer Reduzierung des Effektes, ohne diesen gänzlich zu kompensieren.



**Abb. 6.6: Statistik der SPIM-FCS-Messungen für unterschiedliche Bead-Konzentrationen**

Gezeigt sind die normierten Verteilungen der Messungen für unterschiedliche Konzentrationen von Bead-Lösungen sowie eine Boxplot-Darstellung der Ergebnisse. Während die Maxima der Verteilungen für alle Konzentrationen im Bereich von  $2,0 - 2,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  befindlich sind zeigen sich vor allem für die beiden niedrigsten Konzentrationen auch wesentlich höhere Werte der relativen Häufigkeit für Diffusionskoeffizienten  $> 4 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Dies resultiert wahrscheinlich aus nicht maskierten Pixeln mit einer unzureichenden Anzahl an Partikeln in ihrem Observationsvolumen. Dies führt zu einer Verbreiterung der Verteilung und einer entsprechenden Erhöhung der Mittel- bzw. Medianwerte in Tab. 3. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,002 – 0,04%, Zeitabstand 0,624 – 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)



Konzentration:	0,002%	0,004%	0,01%	0,02%	0,04%
$D_{\text{Mittelw.}} [\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$	$2,85 \pm 1,70$	$2,71 \pm 1,66$	$1,97 \pm 0,97$	$1,74 \pm 0,90$	$1,89 \pm 0,83$
$D_{\text{Median}} [\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$	2,53	2,43	1,84	1,66	1,82

**Tab. 3: Mittel- und Medianwerte der SPIM-FCS-Messungen für unterschiedliche Bead-Konzentrationen**

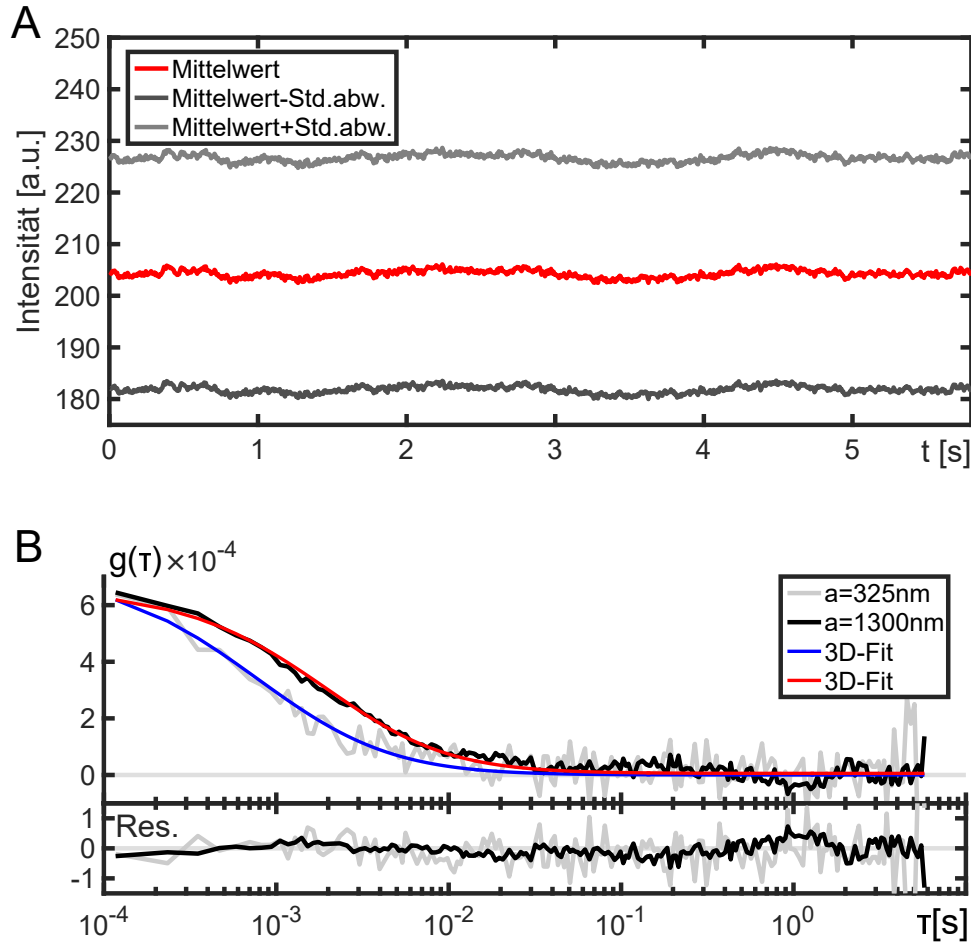
Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Messungen der Verteilungen aus Abb. 6.6 mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung, sowie die Medianwerte. Diese zeigen für Konzentrationsbereiche von 0,01 – 0,04% vergleichbare Werte, die im Rahmen der Fehler mit dem theoretisch erwarteten Wert von  $2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und Ergebnissen früherer SPIM-FCS-Studien übereinstimmen [106]. Eine leichte Erniedrigung der gemessenen Werte könnte durch nicht maskierte Agglomerate entstehen. Die Ergebnisse für niedrigere Konzentrationen zeigen im Vergleich stark erhöhte Werte der Mittel- und Medianwerte, sowie eine starke Verbreiterung der Verteilung, was mit der zu geringen Partikelstatistik der endlichen Messung erklärt werden kann. (*Bead-Größe* 200nm, *Konzentration* 0,002 – 0,04%, *Zeitabstand* 0,624 – 1,208ms, *Bildanzahl* 20000, *Pixelgröße* 162,5nm, *ROI-Größe* 124 × 124 Pixel)

Das vermehrte Auftreten von erhöhten Werten des Diffusionskoeffizienten führt demnach auch zu einer Erhöhung der Mittel- und Medianwerte bei einer gleichzeitigen Verbreiterung der Verteilung (siehe Tab. 3). Ab einer Konzentration  $\geq 0,01\%$  ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten und die erhaltenen Verteilungen der gemessenen Diffusionskoeffizienten sind untereinander vergleichbar. Die erhaltenen Werte sind im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von  $D_{\text{theo}} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und stimmen auch mit den Werten früherer SPIM-FCS-Studien überein [106]. Dies validiert zum einen den Einsatz der SPIM-FCS-Technik an dem in dieser Arbeit vorgestellten Aufbau zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten einer Probe und zeigt gleichzeitig die Limitierung der Technik bei sehr niedrigen Konzentrationen und endlicher Messdauer.

#### Messungen an Kalibrationsproben: Alexa488 an Dextran(10kD)

Um die Qualität von Messungen bei höheren Diffusionskoeffizienten zu testen, wurde als zweite Eichprobe eine Lösung von Dextranmolekülen, an die der Farbstoff Alexa488 gebunden wurde, verwendet (*Dextran, Alexa Fluor 488, 10 kDa MW*, Invitrogen). Die Dextranmoleküle besitzen mit einer Größe von 10kD einen hydrodynamischen Radius in der Größenordnung von  $(3,56 \pm 0,06)\text{nm}$  [151] was zu einem theoretisch erwartetem Diffusionskoeffizienten von  $(60,3 \pm 1,0) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  in Wasser bei  $T = 20^\circ\text{C}$  führt. Die Probe wird für eine SPIM-FCS-Messung von ihrer Stocklösung mittels Milli-Q-Wasser auf eine Konzentration von  $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt und als Tropfen mit einem Volumen von 500 – 700 $\mu\text{l}$  auf ein vorher mit Alkohol gereinigtes Deckgläschen aufpipettiert. Die weiteren Messparameter sind wie folgt:

- Laserleistung (491nm): 50mW
- AOTF (491nm): 6V (Leistung an hinterer Objektiv-Apertur: 19mW )
- 50.000 Einzelaufnahmen + 2.000 Hintergrundaufnahmen
- Kamerabelichtungszeit: 117 $\mu\text{s}$
- Binning (on-chip):  $2 \times 2 - 4 \times 4$
- ROI: (200 × 12) Pixel
- Lichtblattdicke: 1,2 $\mu\text{m}$

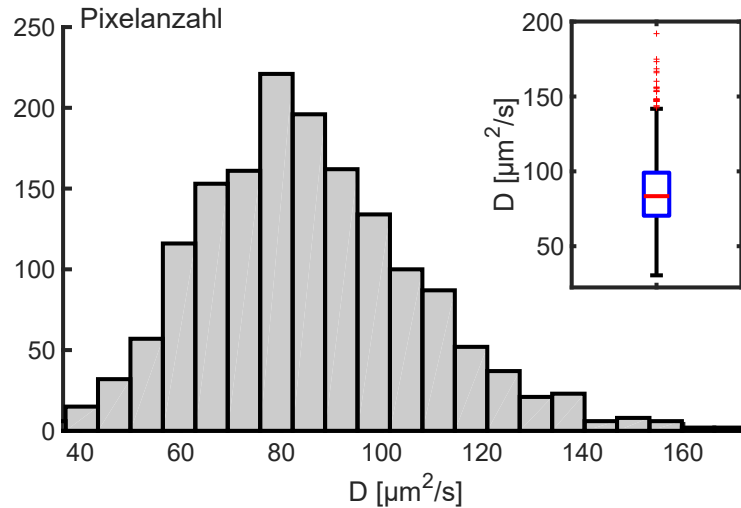


**Abb. 6.7: Intensitätskurve und Autokorrelationskurven einer Alexa-488-Dextran(10kD)-Messung**

(A) Gezeigt ist der zeitabhängige Mittelwert (rot) aller Pixelintensitäten einer Langzeitaufnahme an Alexa-488-Dextran(10kD) in wässriger Lösung. Der Mittelwert, ebenso wie die Werte des Mittelwert abzüglich (dunkelgrau) und zuzüglich (hellgrau) der Standardabweichung, schwankt um ein konstantes Niveau ohne erkennbare Ausreißer, was auf eine weitgehend homogene Probe ohne Agglomerate schließen lässt. (B) Zu sehen sind zwei exemplarische Autokorrelationskurven einzelner Pixel mit unterschiedlichen Binning-Stufen (Binning  $2 \times 2$  mit einer Pixelgröße von 325nm in grau und Binning  $8 \times 8$  mit einer Pixelgröße von 1300nm in schwarz) für eine Messung an Alexa-488-Dextran(10kD) in wässriger Lösung. Der zugehörige Fit (blau bzw. rot) basiert jeweils auf normaler dreidimensionaler Diffusion. Beide Kurven lassen sich mit der gegebenen Zeitauf Auflösung ( $\tau_{\min} = 117\mu\text{s}$ ) noch zufriedenstellend durch das Fit-Modell beschreiben, wobei der Verschluss des Autokorrelationsabfalls zu längeren Diffusionszeiten für die Kurve unter höherem Binning eine entsprechend verlässlichere Aussagekraft des Fits verspricht. (Dextrankonzentration  $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Zeitabstand  $0,117\text{ms}$ , Bildanzahl 50000, Pixelgröße 325 – 1300nm, ROI-Größe  $200 \times 8$  Pixel)

Abb. 6.7 A zeigt eine exemplarische Intensitätskurve einer SPIM-FCS-Messung an der Dextranprobe. Auffällig im Vergleich zur Intensitätskurve in Abb. 6.1 ist das Fehlen von einzelnen Intensitätsspitzen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich keine Agglomerate in der Probe befinden. Eine Autokorrelationskurve für einen einzelnen Pixel in Abb. 6.7 B für zwei unterschiedliche Binning-Stufen zeigt den zu erwartenden schnelleren Abfall der Autokorrelation im Vergleich zu Messungen an Beads. Trotz einer erhöhten Aufnahme rate von 8547fps erfasst

die Zeitauflösung den Abfall der Autokorrelationsfunktion bei kleinen Zeitskalen nur knapp. Gerade bei höheren Binningstufen führt ein einkomponentiger Fit normaler Diffusion an die entsprechenden Autokorrelationskurven dennoch zu einem aussagekräftigem Fit-Ergebnis. Bei der Verwendung eines anomalen Diffusionsmodells ergibt sich für drei unabhängige Messungen eine Verteilung aller Pixel mit einem Mittelwert von Bereich von  $\alpha = 0,80 \pm 0,21$ . Aufgrund der nur geringen Anomalie und der fehlenden Zeitauflösung in Zusammenhang mit der Datenqualität gerade bei kleinen  $\tau$  bei kaum merklicher Verbesserung der Fit-Qualität wird hierbei im Weiteren von einem Szenario einer normalen Diffusion ausgegangen. Eine Auswertung der Daten unter Berücksichtigung einer möglichen Strömung ergibt für die verwendeten Datensätze größtenteils verschwindende Flussgeschwindigkeiten mit Medianwerten von  $v_{Fluss} < 0,15 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ , weshalb auch dieses Szenario in der weiteren Auswertung der Datensätze nicht weiter berücksichtigt wird. SPIM-FCS-Messungen an der Probe ergeben einen Mittelwert des Diffusionskoeffizienten von  $(86,07 \pm 22,66) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einem Medianwert von  $83,75 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (siehe Abb. 6.8 für die Verteilung einer Einzelmessung) und liegen damit oberhalb des theoretisch erwarteten Wertes von  $(60,3 \pm 1,0) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ .



**Abb. 6.8: Statistik einer Alexa-488-Dextran(10kD)-Messung**

Die Statistik der gemessenen Diffusionskoeffizienten der gezeigten Messung zeigt eine Verteilung um einen Mittelwert von  $85,70 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Medianwert:  $83,43 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) mit einer Standardabweichung von  $22,21 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Die zugehörige Darstellung als Boxplot zeigt ca. 1,6% der gemessenen Werte als Ausreißer zu höheren Diffusionskoeffizienten ( $> 141,79 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ). Der Mittel- und Medianwert der Verteilung liegt bei höheren Werten im Vergleich zum theoretisch erwarteten Diffusionskoeffizienten von  $(60,3 \pm 1,0) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ , wird jedoch im Rahmen der Fehler durch die in einer konfokalen FCS-Messungen gemessenen Werte von  $(95,16 \pm 2,95) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  bestätigt. Die zu niedrigeren Werten verschobenen Ergebnisse der SPIM-FCS-Messungen können hierbei in der niedrigeren Zeitauflösung begründet sein. (Dextrankonzentration  $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Zeitabstand  $0,117 \text{ms}$ , Bildanzahl 50000, Pixelgröße  $325 \text{nm}$ , ROI-Größe  $200 \times 8 \text{ Pixel}$ )

Konfokale FCS-Messungen an der gleichen Probe (durchgeführt von dem Master-Studenten Dirk Hofmann) liefern Werte im Bereich  $(95,16 \pm 2,95) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  [141] und sind somit ebenfalls deutlich über dem theoretischem Wert, jedoch im Rahmen der Fehler trotz eines erhöhten Mittelwerts übereinstimmend mit den mittels SPIM-FCS ermittelten Ergebnissen. Ein möglicher Grund einer

schnelleren gemessenen Diffusion könnte eine etwaige Trennung von Alexa-488 von den Dextranmolekülen sein. Diese zusätzliche Komponente an freien Alexa-Molekülen in der Lösung würde zu einer Erhöhung des effektiv gemessenen Diffusionskoeffizienten in einem einkomponentigem Fit führen. Ein Versuch dies über einen zweikomponentigen Fit an den SPIM-FCS und konfokalen FCS-Daten zu ermitteln blieb ohne schlüssige Ergebnisse. Unter der Annahme, dass die freie Alexa-Komponente der Grund für eine Verschiebung hin zu einer schnelleren gemessenen Diffusion ist, kann der im Vergleich zur konfokalen Messung tendenziell niedrigere Wert der SPIM-FCS-Messung mit der niedrigeren Zeitauflösung der Messung begründet werden. Die gezeigten Messungen an Alexa zeigen die Möglichkeit unter einer entsprechenden Erhöhung des Fehlers selbst die schnelle Diffusion von Dextranmolekülen in wässriger Lösung in einer SPIM-FCS-Messung zu quantifizieren und liefern vergleichbare Ergebnisse zu konfokalen FCS-Messungen.

### Experimentelle Abschätzung der lateralen Auflösung in einer SPIM-FCS-Messung

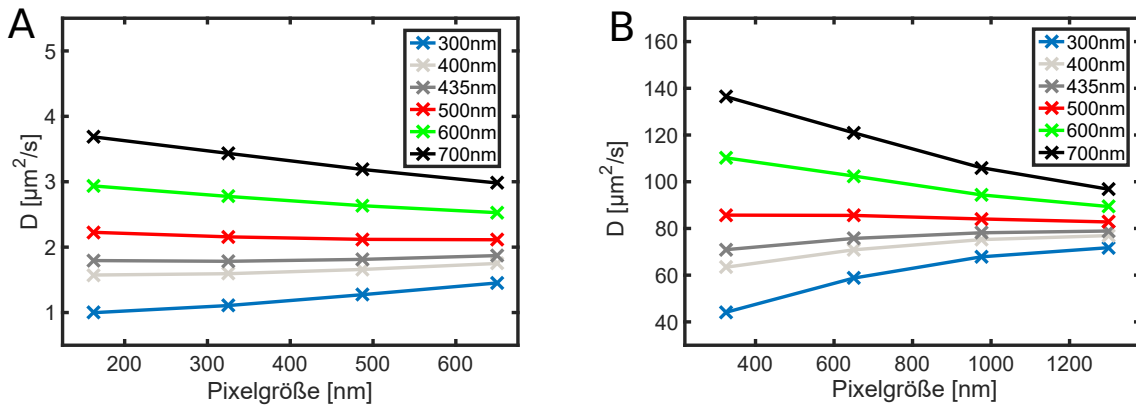
Der lateralen Auflösung der System-PSF  $\sigma_{\text{det},xy}$  kommt für die korrekte Bestimmung des Diffusionskoeffizienten aus der charakteristischen Zeitskala des Autokorrelationsabfalls eine besonders kritische Bedeutung zu (siehe Gl. 3.33 bzw. Gl. 3.34). Bei einem korrekt bestimmten Wert von  $\sigma_{\text{det},xy}$  müssen Auswertungen der Datensätze für den Fall einer normalen Diffusion für Messungen mit unterschiedlichen Pixelabmessungen  $a$  beziehungsweise für unterschiedliche Binning-Stufen vergleichbare Werte des Diffusionskoeffizienten zur Folge haben. Eine Verwendung der zuvor experimentell bestimmten Werte der lateralen Auflösung aus gemessenen Profilen an Beads (siehe Unterkap. 4.3) führte im Rahmen dieser Arbeit zu einem leichten Anstieg der gemessenen Diffusionskoeffizienten bei der Auswertung von Datensätzen mit ansteigendem Binning (siehe Abb. 6.9).

Da dieses Problem für kamerabasierte FCS-Messungen bekannt ist, hat sich eine experimentelle Bestimmung der lateralen Auflösung aus den eigentlichen SPIM-FCS-Messungen etabliert [38, 102, 104, 106, 107, 152]. Hierbei wird die Aufnahme einer homogenen Probe (Beads oder Farbstoffe in Lösung) über mehrere Binningstufen mit unterschiedlichen Werten der lateralen Auflösung um den zuvor experimentell bestimmten oder theoretischen erwarteten Wert für  $\sigma_{\text{det},xy}$  ausgewertet. Dies führt für größere Pixelabmessungen bei zu niedrigen Werten von  $\sigma_{\text{det},xy}$  zu einem Anstieg der gemessenen Diffusionskoeffizienten bzw. einem Abfall bei zu hohen Werten (siehe Abb. 6.9). Ein abnehmender Einfluss von  $\sigma_{\text{det},xy}$  auf die Größe des Observationsvolumens bei Pixelgrößen  $a \gg \sigma_{\text{det},xy}$  führt zu einer Annäherung der so gemessenen Diffusionskoeffizienten zu dem korrekten Wert. Aus den so erhaltenen Auswertungen lässt sich nun der Wert für  $\sigma_{\text{det},xy}$  bestimmen, bei dem der erhaltene Diffusionskoeffizient für unterschiedliche Pixelgrößen konstant bleibt. Dies geschieht in einem zweiten Schritt, in dem der gemittelte Wert der erhaltenen Diffusionskoeffizienten aus den vorhergehenden Auswertungen für große Pixelabmessungen als fixer Fit-Parameter verwendet wird und die laterale Auflösung als offener Fit-Parameter ermittelt wird.

Diese Art der Auswertung erbrachte im Rahmen dieser Arbeit effektive Werte für  $\sigma_{\text{det},xy}$  im Bereich von  $(508,62 \pm 97,43)\text{nm}$  als Mittelwert mit Standardabweichung aus Messungen an Alexa488 an Dextran(10kD) und  $(498,09 \pm 128,65)\text{nm}$  für Messungen an 200nm Beads bei einer Konzentration von 0,04%. Die so erhaltenen Mittelwerte der lateralen Auflösung liegen somit leicht oberhalb des experimentell bestimmten Wertes aus Unterkap. 4.3 und zeigen vergleichbare Werte für unterschiedliche Proben. Diese Methode zur Bestimmung der Auflösung ist aufgrund der hohen Standardabweichung der erhaltenen Diffusionskoeffizienten (diese betragen ca. 50% des gemessenen Mittelwertes des Diffusionskoeffizienten für Beads-Messungen bzw. 15 – 20% für Messungen an Alexa-488-Dextran(10kD)) nur bedingt als optimal zu bewerten, da sich so ein großer Bereich an Werten der lateralen Auflösung findet, in denen der mittlere

Diffusionskoeffizient im Rahmen der Fehler konstant bleibt. Für eine korrekte Bestimmung des Diffusionskoeffizienten ist zudem eine entsprechende Kalibration der Auflösung vor jedem Messzyklus durchzuführen. Eine Alternative zu dieser Methode wäre z.B. die Eichung der lateralen Auflösung anhand einer Messung an einer Probe mit bekannten Diffusionskoeffizienten, ähnlich zur Fokuskalibration in einem konfokalen FCS-Aufbau.

Als zugrundeliegende Ursache der Abweichung zwischen den aus den Intensitätsprofilen bestimmten Werten der Auflösung einer Bead-Aufnahme zu den über die SPIM-FCS-Messung ermittelten Werten wurde zum einen der Einfluss der Pixelgröße auf die Auflösungsbestimmung anhand der Intensitätsprofile von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze aufgeführt [38]. Eine weitere Ursache ist eine Abweichung der tatsächlichen Fokusgeometrie, welche im Rahmen des Fit-Modells in den drei Raumdimensionen genähert als Gaußfunktion beschrieben wird, dessen tatsächliche Form allerdings aus der Faltung mit dem Anregungsprofil gemäß eines Gaußstrahl (siehe Gl. 3.8) entsteht [38]. Da die Verwendung dieser realitätsnäheren PSF-Form allerdings mit einer rechenaufwändigen numerischen Integration bei der Implementierung des Fit-Modells einhergehen würde, wird im Rahmen dieser Arbeit die gaußfunktionsbasierte PSF mit der korrigierten lateralen Auflösung nach obiger Beschreibung verwendet.



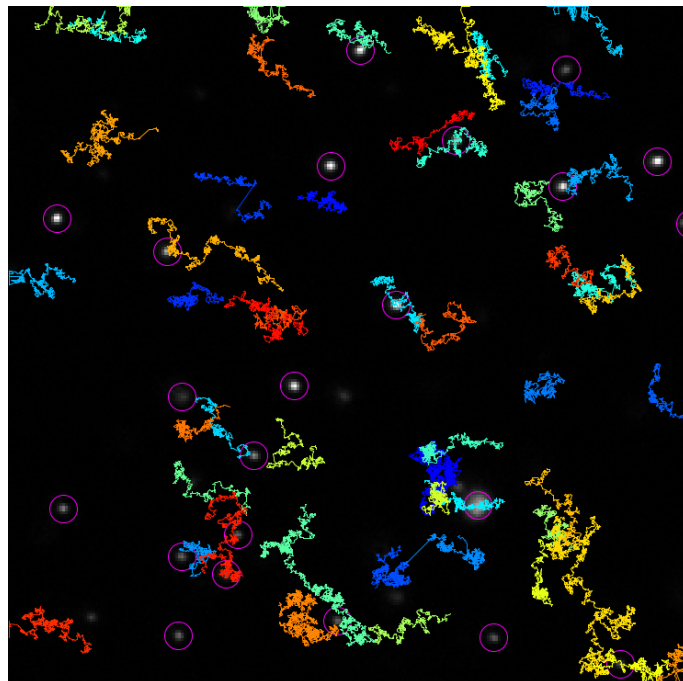
**Abb. 6.9: Eichkurven zur Bestimmung der lateralen Auflösung**

(A) Gezeigt sind die Werte der gemittelten Diffusionskoeffizienten einer SPIM-FCS-Messung an 200nm Beads bei ansteigender Pixelgröße durch Binning. Hierbei wurden die Werte der lateralen Auflösung in einem Bereich von  $\sigma_{\text{det},xy} = 300 - 700\text{nm}$  variiert. Die Werte zeigen für ein ansteigendes Binning der Datensätze einen Abfall bzw. Anstieg der Diffusionskoeffizienten für kleine bzw. große Werte der lateralen Auflösung. Die Mittelwerte zeigen für einen Wert von  $\sigma_{\text{det},xy} = 500\text{nm}$  einen annähernd konstanten Mittelwert des Diffusionskoeffizienten über alle Pixelgrößen. Die Fehlerbalken aus der Standardabweichung betragen jeweils ca. 50% der gemessenen Mittelwerte und werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. (B) Die gemittelten Diffusionskoeffizienten einer Messung an Alexa-488-Dextran(10kD) in wässriger Lösung zeigt über den untersuchten Bereich an Pixelgrößen eine stärkere Abhängigkeit der Mittelwerte für ein ansteigendes Pixelgrößen. Auch hier ist für  $\sigma_{\text{det},xy} = 500\text{nm}$  ein stabiler Wert des Diffusionskoeffizienten zu erkennen, während die in einem vorhergehendem Beadscan ermittelte Auflösung von  $\sigma_{\text{det},xy} \approx 435\text{nm}$  weiterhin zu einem Anstieg führt. Die Fehlerbalken aus der Standardabweichung betragen 15 – 20% der Mittelwerte und werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. (A: Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,04%, Zeitabstand 0,624ms, Bildanzahl 20000, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel ; B: Dextrankonzentration 2,5µg/µl, Zeitabstand 0,117ms, Bildanzahl 50000, ROI-Größe  $200 \times 8$  Pixel)

## 6.2. Single Particle Tracking

Neben der zuvor beschriebenen Implementierung und Durchführung quantitativer Diffusionsmessungen mittels SPIM-FCS soll nun in einem nächsten Schritt eine weitere Art der Diffusionsmessung am SPIM-Aufbau realisiert werden. Hierfür findet die Implementierung einer Einzelpartikelverfolgung (siehe Unterkap. 3.2.2) am Lichtblattmikroskop statt. Dies erfolgt vorrangig zur Überprüfung der SPIM-FCS-Ergebnisse aus Messungen an einzelnen diffundierenden Partikeln (Beads). Die in diesem Abschnitt verwendeten Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Beads in wässriger Lösung sind demnach identisch zu den bereits im Unterkap. 6.1 beschriebenen. Die Implementierung der Einzelpartikelverfolgung im SPIM-Aufbau erfolgt unter den nachfolgend beschriebenen Rahmenbedingungen.

Zunächst erfolgt die Langzeitaufnahme von Partikeln, mit Größenabmessungen und in einer Teilchenkonzentration, die es erlauben, einzelne Partikel getrennt voneinander aufzunehmen, um deren Position anhand der Bildaufnahme zu bestimmen. Zur eindeutigen Verfolgung der Partikeltrajektorien muss entsprechend der erwarteten Zeitskala der Bewegung eine Bildaufnahme rate gewählt werden, die hoch genug ist, um die Partikelbewegung bzw. -zuordnung möglichst fehlerfrei sicherzustellen. Eine Zeitaufnahme des Kamerahintergrunds kann verwendet werden, um diesen nach einer Mittelung von den Einzelaufnahmen der Partikel abzuziehen, um die Partikelidentifizierung durch einen erhöhten Kontrast zu verbessern. Die verwendeten Bildaufnahme parameter für eine Lösung von Beads mit einem Durchmesser von  $d = 200\text{nm}$



**Abb. 6.10: Exemplarische Aufnahme einer Partikelverfolgung in Trackmate**

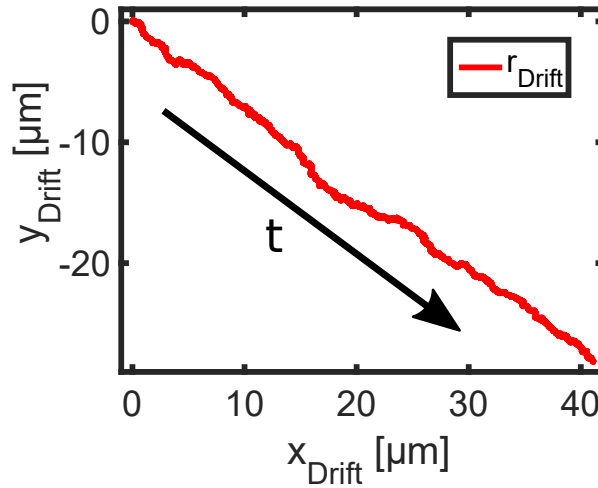
Zu sehen ist eine Einzelaufnahme einer SPIM-Messung fluoreszenzmarkierter Partikel. Zusätzlich sind die in der Aufnahme vom Tracking-Algorithmus erkannten Partikel in Form von violetten Kreisen markiert, sowie farblich markiert exemplarische Trajektorien der Gesamtaufnahme aus insgesamt 20.000 Bildern gezeigt. Einzelne Trajektorien zeigen hier eine Vorzugsrichtung entlang der Bilddiagonale zwischen oberer linker und unterer rechter Bildecke, was für einen Fluss in der Probe spricht, welche die brownsche Bewegung der Teilchen in der wässrigen Lösung überlagert. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe 124 × 124 Pixel*)

sind identisch zu den in Unterkap. 6.1 beschriebenen Werten. Nach der Aufnahme einer ausreichend langen Zeitreihe und dem Abzug des gemittelten Hintergrunds werden die einzelnen Trajektorien mithilfe des ImageJ-Plugins *TrackMate* (v2.8.1) [153] ermittelt (siehe Abb. 6.10). Innerhalb dieser Tracking-Software werden dabei zunächst die einzelnen Partikel in den Einzelaufnahmen anhand eines Fits am Intensitätsprofil der Partikel in der Bildebene mit einer Genauigkeit unterhalb der Pixelabmessung detektiert und in einem zweiten Schritt über einen Tracking-Algorithmus verbunden bzw. die einzelnen Tracks erstellt. Innerhalb der *TrackMate*-Software werden zunächst die aufnahmespezifischen Größen der Pixelabmessungen und Zeitabstände der Einzelaufnahmen eingegeben. Die relevanten Optionen der Parametereinstellungen zur Auswertung der Datensätze sind wie folgt:

- Wahl des Partikeldetektionsalgorithmus - hier wurde ein *Laplacian of Gaussian* (LoG) verwendet
- spezifische Detektionsalgorithmusparameter - bei der Verwendung eines LoG z.B. Wahl des Detektionsdurchmessers - hier wurde ein Durchmesser von 15 Pixeln (2,44  $\mu\text{m}$ ) und ein softwareinterner Qualitätsthreshold [153] von 30 verwendet
- optionale Selektion der erkannten Partikelpositionen anhand softwarespezifischer Qualitätsparameter
- Wahl des Tracking-Algorithmus: hierfür wurde der *Simple LAP tracker* (*Linear Assignment Problem*) verwendet
- spezifische Trackingalgorithmusparameter - bei der Verwendung des *simple LAP-Trackers*: maximale Entfernung der Partikelpositionen, maximale Anzahl an Detektionslücken und maximale Entfernung zur Lückenschließung in Bezug auf die Verfolgung der Partikelpositionen in aufeinanderfolgenden Aufnahmen - hier wurden eine maximale *Linking distance* von 15 Pixeln und keine Lücken in der Detektion verwendet
- optionale Möglichkeiten weiterer Filter der erkannten Partikeltrajektorien anhand unterschiedlicher Parametergrößen der Auswertung (z.B. Trajektorienlänge, mittlere Geschwindigkeit, maximaler Abstand)
- Analyse- und Darstellungsumgebungen bzgl. unterschiedlicher Trajektorieneigenschaften
- Export der Trajektorien und weiterer Auswertungscharakteristika

Die Anzahl der so erhaltenen Partikeltrajektorien liegen für die getätigten Messungen bei obigen Parametern und Beads-Konzentrationen von 0,002 – 0,04% im Bereich von ca.  $1 - 2 \cdot 10^4$  Einzeltrajektorien für eine Einzelmessung. Diese Trajektorien werden in Form einer .xml-Datei exportiert und zur weiteren Auswertung in *Matlab* eingeladen. Die weitere Auswertung der Trajektorien erfolgt in einem angepasstem *Matlab*-Skript, basierend auf der Software *@msdalyzer* [154].

Zunächst lassen sich die Datensätze bei einer vermuteten Strömung auf eine eventuelle Drift testen. Hierfür kann zum eine Drift des Massenmittelpunkts  $r_M = \sum_{i=1}^N r_i$  aller  $N$  detektierten Teilchen in aufeinanderfolgenden Aufnahmen verwendet werden. Diese Methode ist jedoch nur stabil für eine große Anzahl an Teilchen, die im Idealfall während der Messung konstant bleibt, und erweist sich gerade bei einer begrenzten Partikelanzahl als sehr fehleranfällig. Eine andere Methode ist die Verwendung einer Geschwindigkeitskorrelation. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Positionsverschiebungen  $\Delta r_i$  eines Teilchens aus einem unkorreliertem diffusiven Anteil und einem korreliertem Driftanteil nach  $\Delta r_i = \Delta r_{i,\text{diff}} + v_{\text{Drift}} \cdot \Delta t$  gegeben ist.



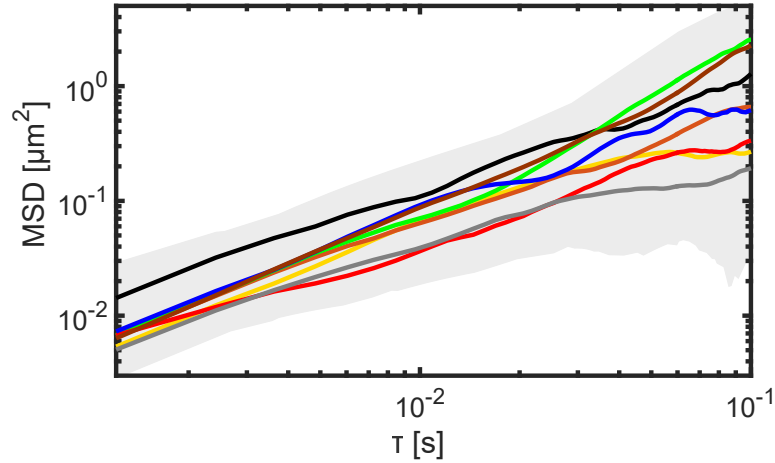
**Abb. 6.11: Ergebnis einer Flussanalyse aus einer Geschwindigkeitskorrelation**

Gezeigt ist die zeitliche Verschiebung  $r_{\text{Drift}}(t)$  der Partikeltrajektorien aus einer Geschwindigkeitskorrelation aller Trajektorien in Abb. 6.10. Der zeitliche Verlauf der Verschiebung zeigt deutlich eine zeitlich nahezu konstante Drift in die untere linke Ecke des Bildes mit einer Geschwindigkeit von  $v_{\text{Drift}} = (2,09 \pm 0,19) \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  (Mittelwert + Standardabweichung über alle Zeitpunkte). Anhand der so zeitlich erfassten Drift  $r_{\text{Drift}}$  können die Einzeltrajektorien entsprechend korrigiert und eine Überschätzung des MSD vermieden werden. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel*)

Eine Mittelung über alle Teilchen zum Zeitpunkt  $t$  ergibt so eine Ensemblesgeschwindigkeit  $\langle v \rangle_E(t) = \frac{1}{N(t)} \sum_{i=1}^N (\Delta r_{i,\text{diff}} / \Delta t + v_{\text{Drift}})$ , bei der die unkorrelierten Anteile von  $\Delta r_{i,\text{diff}} / \Delta t$  verschwinden, was zu einer Driftgeschwindigkeit von  $v_{\text{Drift}} = \langle v \rangle_E(t)$  führt. Die entsprechende Verschiebung der Trajektorien aufgrund der Drift ergibt sich demnach aus  $r_{\text{Drift}}(t) = \int_0^t \langle v \rangle_E(t') dt'$ .  $r_{\text{Drift}}(t)$  kann dementsprechend von den Einzeltrajektorien der getrackten Partikel abgezogen werden, um den Einfluss auf deren MSD zu kompensieren [154]. Ein Beispiel einer solchen Driftanalyse für die zuvor gezeigte Messung ist in Abb. 6.11 gezeigt. Aus den zeitlichen Verlauf von  $r_{\text{Drift}}$  zeigt sich eine deutliche Verschiebung der Partikeltrajektorien nach rechts unten, was die Vermutung einer Drift bestätigt. Die Flussgeschwindigkeit  $v_{\text{Drift}} = r_{\text{Drift}}(t)/t = (2,09 \pm 0,19) \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  liegt hierbei in derselben Größenordnung wie Ergebnisse vorhergehender SPIM-FCS-Auswertungen (siehe Abb. 6.5 B).

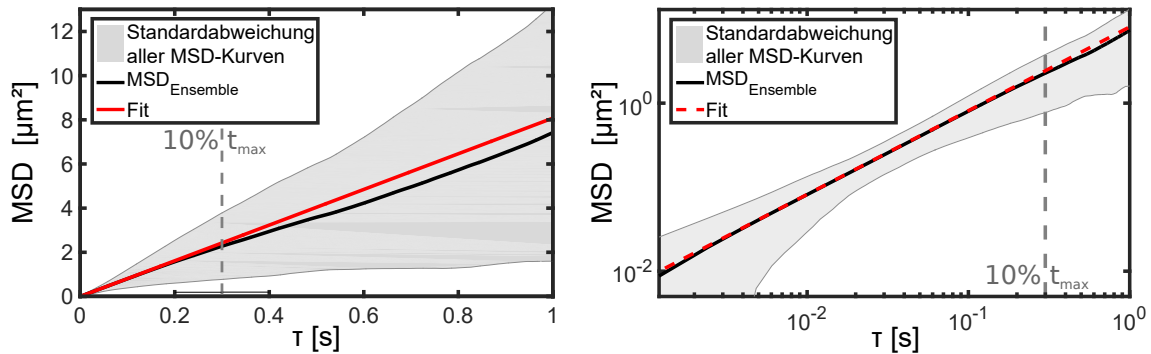
Aus den flusskorrigierten Einzeltrajektorien lässt sich nun das zeitlich gemittelte MSD der jeweiligen Trajektorie nach  $\langle \text{MSD}(\tau) \rangle_t = \langle (x(t_i + \tau) - x(t_i))^2 + (y(t_i + \tau) - y(t_i))^2 \rangle_t$  berechnen. Ein Beispiel der MSD-Verläufe aller Einzeltrajektorien einer Messung mit einer Mindestlänge von 1s ist in Abb. 6.12 gezeigt. Neben einem weitgehend linearen Verlauf der MSD-Kurven über drei Größenordnungen an Zeitskalen zeigt sich eine erhebliche Breite an Verläufen für die Einzeltrajektorien. Für eine stabile Bestimmung des Diffusionskoeffizienten kann hierbei die Berechnung eines gewichteten Ensemblemittels aus allen MSD-Verläufen der Einzeltrajektorien zu einer einzelnen MSD-Kurve nach  $\text{MSD}_{\text{Ensemble}}(\tau) = \sum_{i=1}^N (w_i \cdot \langle \text{MSD}_i(\tau) \rangle_t) / \sum_{i=1}^N w_i$  über alle  $N$  Trajektorien erfolgen. Der Gewichtungsfaktor  $w_i$  ergibt sich hierbei aus der Anzahl der Instanzen des Zeitabstandes  $N(\tau)_i$  in der betroffenen Trajektorie, wodurch der Einfluss langer Trajektorien bei kleinen Zeitabständen wächst. Das Ergebnis einer solchen Ensemblemittelwertberechnung ist in Abb. 6.13 gezeigt.





**Abb. 6.12: MSD-Kurve einzelner Partikeltrajektorien einer Messung**

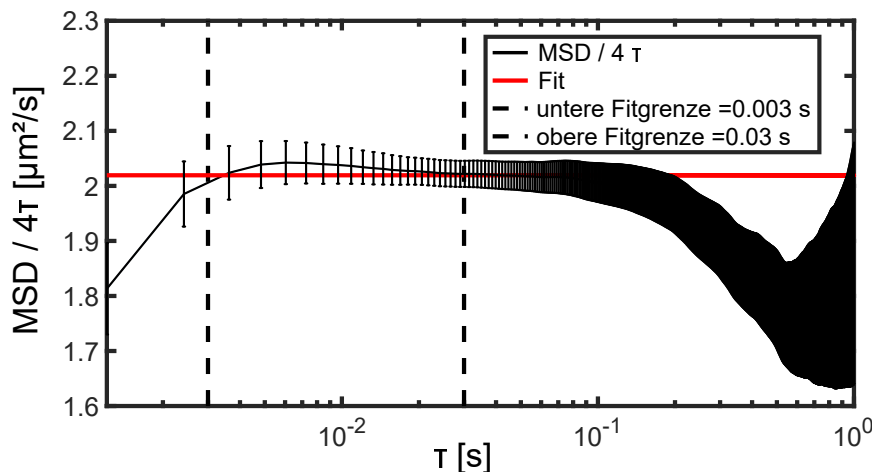
Aufgetragen sind die Beispiele der zeitlich gemittelten Kurven des mittleren Verschiebungsquadrats der längsten Trajektorien aus der Messung in Abb. 6.10 in doppellogarithmischer Darstellung. Die graue Fläche kennzeichnet den Bereich innerhalb der Extremkurven aller Trajektorien mit einer Länge  $> 1$  s. Neben einer gewissen Streuung der Einzeltrajektorien zeigen die Graphen über den Bereich an Zeitabständen von  $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ s} < \tau < 1 \cdot 10^{-1} \text{ s}$  einen weitgehend linearen Verlauf einer normalen Diffusion. (*Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel*)



**Abb. 6.13: MSD-Kurve aus dem Ensemblemittel mehrerer Einzeltrajektorien**

Zu sehen ist der Verlauf der MSD-Kurve (schwarz) eines Ensemblemittels aller Trajektorien der Messung in Abb. 6.12 im Bereich von 1,2ms – 1s in linearer und doppellogarithmischer Auftragung. Die gewichtete Standardabweichung der Einzelkurven ist als graue Fläche markiert und zeigt eine deutliche Verbreiterung der gemessenen MSD-Werte bei größeren Zeitabständen aufgrund der schlechteren Statistik. Ein auf Gl. 2.5 basierender Fit (rot) einer normalen Diffusion mit  $D = (2,019 \pm 0,003) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ , welcher mittels eines Fits in einem reduzierten Bereich von  $\tau = [0,003 \text{ s} - 0,03 \text{ s}]$  erstellt wurde, beschreibt den Verlauf der MSD-Kurve für kleine Zeitabstände, mit geringen Abweichungen für die kürzesten Zeitabstände. Für längere Zeitabstände sind Abweichungen zu geringeren gemessenen MSD-Werten zu erkennen.

Der Verlauf von  $MSD_{\text{Ensemble}}$  wird durch einen Fit basierend auf normaler Diffusion gemäß  $MSD = D \cdot 4\tau$  innerhalb des Bereichs kurzer Zeitabstände gut erfasst. Der Fit basiert hierbei auf einem reduzierten betrachteten Bereich an Zeitabständen von  $\tau = [0,003\text{s} - 0,03\text{s}]$ . Der Grund für diese Einschränkung des Fit-Bereichs ist wie folgt. Um eine bessere Darstellung des Verlaufs der MSD-Kurve zu bekommen wird der berechnete Diffusionskoeffizient als  $MSD/4\tau$  gegen  $\tau$  aufgetragen (siehe Abb. 6.14). Im Falle einer normalen Diffusion sollte diese Art der Auftragung im Rahmen der Fehler einen weitgehend konstanten Verlauf zeigen. Wie in Abb. 6.14 zu erkennen ist, ist dies für die gezeigte Messung nur für einen begrenzten Bereich an Zeitabständen der Fall. Der Fehler ergibt sich hierbei aus  $S_g/\sqrt{F}$  mit der gewichteten Standardabweichung  $S_g$  und der Anzahl der Freiheitsgrade  $F$  des gewichteten Mittelwertes [154]. Bei den kürzesten Zeitabständen der Messung treten hier Abweichungen der Diffusionskoeffizienten zu niedrigeren Werten aus einer möglichen Unterschätzung der MSD-Werte auf. Abweichungen für solch kleine Zeitabstände können sowohl aus einem statischen Lokalisationsfehler (z.B. aufgrund von Rauschen in der Aufnahme) [155], als auch aus einem dynamischen Fehler der Positionszuordnung aufgrund einer endlich langen Integrationszeit der Kamera während der Teilchenbewegung herkommen [156, 157]. Während der erste Effekt zu einer Überschätzung des MSD führt, kann der zweite Effekt eine Unterschätzung des MSD zur Folge haben, was in der gezeigten Kurve dominant zu sein scheint. Ein so zunächst vermeintlich superdiffusives Verhalten innerhalb der ersten Zeitabstände wurde in allen vergleichbaren Aufnahmen vorgefunden.

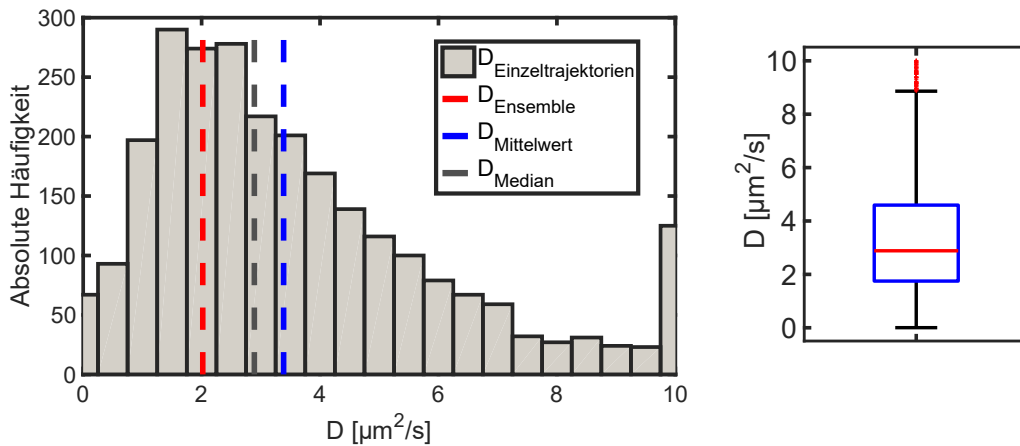


**Abb. 6.14:** Bestimmung des Fit-Bereichs aus  $MSD/4\tau$  gegen  $\tau$

Zur Überprüfung des Diffusionsverhaltens über unterschiedliche Zeitskalen wird der Diffusionskoeffizient nach Gl. 2.5 als  $D = MSD/4\tau$  anhand der ermittelten MSD-Werte des Ensemblemittels gegen den Zeitabstand  $\tau$  aufgetragen (schwarze Kurve mit Fehlerbalken). Nach einer anfänglich kurze Erhöhung des Wertes ist ein weitgehend konstanter Verlauf über drei Größenordnungen an Zeitabständen zu erkennen, was eine normale Diffusion auf dieser Zeitskala mit einem wiedergibt. Für größere Zeitskalen ist ein Abfall der MSD-Werte zu erkennen, der durch unzureichende Statistik und Wechselwirkung der Teilchen auf größeren Zeitabständen erklärt werden kann. Der Fit aus Abb. 6.13, basierend auf den Werten eines reduzierten Fit-Bereichs der Zeitabstände von  $\tau = [0,003\text{s} - 0,03\text{s}]$ , beschreibt den Verlauf für diese und vergleichbare Messungen und bleibt innerhalb der Fehlergrenzen der aus den MSD-Werten abgeleiteten Diffusionskoeffizienten. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

Für anwachsende Zeitabstände ergibt sich im weiteren Verlauf ein Plateaubereich über zwei bis drei Größenordnungen an Zeitskalen, innerhalb derer sich ein im Rahmen der Fehler konstanter Diffusionskoeffizient von  $D_{\text{Ensemble}} = (2,019 \pm 0,003) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  zeigt. Dieser liegt somit im Bereich des erwarteten Diffusionskoeffizient  $D_{\text{theo}} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und bestätigt für diese Zeitskalen auch die Annahme einer normalen Diffusion. Für größere Zeitabstände sind wiederum erneut Abweichungen des Kurvenverhaltens zu beobachten. In der gezeigten Auswertung sinken die Werte und deuten damit ein subdiffusives Verhalten an, während bei den größten Zeitabständen  $\tau > 0,5\text{s}$  aufgrund der zu niedrigen Statistik keine wirkliche Aussage mehr getroffen werden kann. Eine mögliche Wechselwirkung der Teilchen untereinander könnte hier das subdiffusive Verhalten bei größeren Zeitskalen erklären [109].

Neben der Verwendung der gemittelten MSD-Kurve lassen sich die Einzeltrajektorien auch separat auswerten und die Statistik der so erhalten Diffusionskoeffizienten vergleichen. Hierbei werden aus den MSD-Kurven aller Einzeltrajektorien in einer Qualitätskontrolle nur diejenigen für die Statistik verwendet, die in Ihrem Fit ein Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,9$  aufweisen, um Ausreißer zu beseitigen. Ein beispielhaftes Ergebnis für eine solche Auswertung ist in Abb. 6.15 gezeigt.



**Abb. 6.15: Verteilung der ermittelten Diffusionskoeffizienten aus Einzeltrajektorien**

Die Abbildung zeigt links das Histogramm der ermittelten Diffusionskoeffizienten aller ausgewerteten Einzeltrajektorien mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,9$  der Messung aus Abb. 6.10 (2608 von 12950 Einzeltracks) sowie eine Darstellung in Form eines Boxplot rechts davon. Aufgrund einzelner stark erhöhter Werte des gemessenen Diffusionskoeffizienten mit  $D > 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (114 von 2608 Tracks) wurden die Darstellungen jeweils auf einen Bereich von  $D = 0 - 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  eingeschränkt. Zudem sind die Werte aus dem MSD des Ensemblemittels in Abb. 6.13 (rot) sowie der Mittel- (blau) und Medianwert (grau) der Verteilung im reduzierten Wertebereich eingezeichnet, mit  $D_{\text{Ensemble}} = (2,019 \pm 0,003) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ,  $D_{\text{Mittelwert}} = (3,38 \pm 2,11) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Median}} = 2,89 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Das Histogramm zeigt ein Maximum in der Nähe des Werts aus dem Fit am Ensemblemittel sowie einen nicht vernachlässigbaren Anteil gemessener Werte des Diffusionskoeffizienten größer dem theoretisch erwarteten Wert  $D_{\text{theo}} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ , was zu entsprechend erhöhten Werten des Mittel- und Medianwertes führt. Die erhöhten Werte des Diffusionskoeffizienten lassen sich am wahrscheinlichsten mit nicht kompensierten Tracking-Fehlern der Auswertung erklären. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

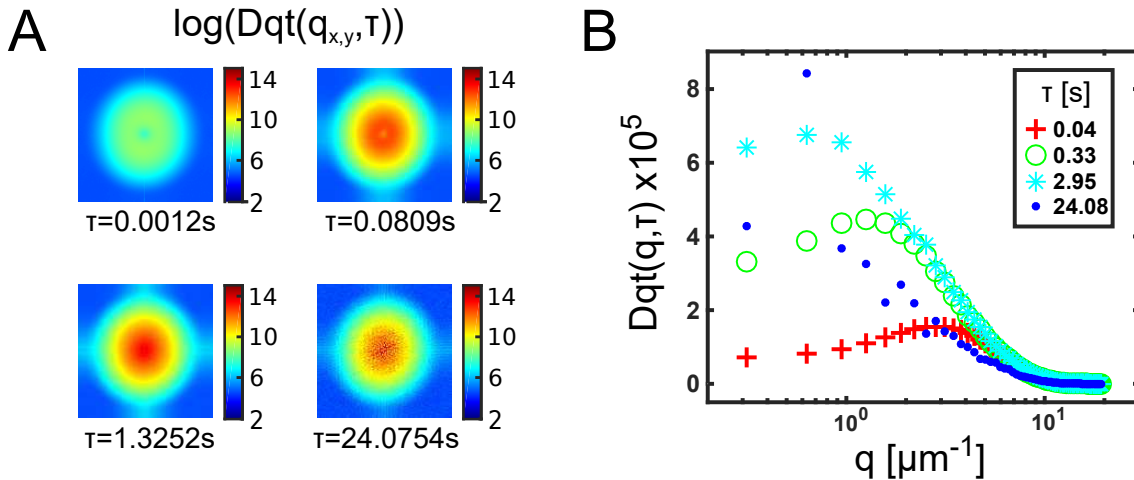
Die Verteilung der ermittelten Diffusionskoeffizienten von 2608 verwendeten Fits aus ursprünglich 12950 Einzeltracks besitzt ein Maximum in der Nähe des aus dem Ensemblemittel bestimmten Werts  $D_{\text{Ensemble}} = (2,019 \pm 0,003) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Ebenso erscheinen vereinzelte Diffusionskoeffizienten mit Werten weit oberhalb des theoretisch erwarteten Diffusionskoeffizienten mit  $D > 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Diese könnten auf teilweise falsche Zuordnungen von Partikelidentitäten während der Trajektorienverfolgung hindeuten und verschieben die Mittel- und Median-Werte der Verteilung zu höheren Werten im Vergleich zum theoretisch erwarteten Wert. Werden nur Werte in einem realistischen Wertebereich  $D = 0 - 10 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  berücksichtigt, ergeben sich ein Mittel- und Medianwert von  $D_{\text{Mittelwert}} = (3,38 \pm 2,11) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Median}} = 2,89 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Da diese Werte aus der Einzeltrajektorienauswertung immer noch vergleichsweise hoch im Vergleich zu dem theoretisch erwarteten Wert liegen, wird das Ergebnis des Ensemblemittels hier als vertrauenswürdiger eingeschätzt. Die Ergebnisse aus Auswertungen der ensembledgemittelten MSD-Kurven im reduzierten Zeitbereich von  $\tau = [0,003\text{s} - 0,03\text{s}]$  von je drei unabhängigen Messungen für Beads-Konzentrationen von 0,002% und 0,004% lieferten Mittelwerte von  $D_{0,002\%} = (2,011 \pm 0,016) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{0,004\%} = (2,014 \pm 0,004) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Diese Werte bestätigen die Ergebnisse von SPIM-FCS-Messungen (siehe Unterkap. 6.1) und liegen im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes. Auswertungen an Messungen höherer Konzentrationen im Bereich von 0,01 – 0,04% zeigten eine starke Störanfälligkeit des Trackings aufgrund einer zu hohen Teilchendichte. Dies resultierte in einem stark subdiffusiven Verhalten der MSD-Werte bzw. einem kontinuierlichen Abfall des Verlaufs der daraus berechneten Diffusionskoeffizienten in einer Auftragung gemäß Abb. 6.14 ohne Plateau einer brownischen Diffusion.

Im Vergleich zu SPIM-FCS-Messungen zeigt sich ein deutlich reduzierter Bereich an Bead-Konzentrationen, in dem die SPT-Messungen am SPIM-Aufbau zur Quantifizierung des Diffusionsverhaltens der verwendeten Probe genutzt werden können. Die vorgestellten Messungen bei niedrigeren Konzentrationen zeigen dennoch die Möglichkeit der Diffusionsbestimmung aus den aus Bildaufnahmen gewonnenen Partikeltrajektorien.

### 6.3. Differential Dynamic Microscopy

Neben den bereits weithin etablierten Methoden zur Diffusionsbestimmung durch FCS- und SPT-Messungen wird im Rahmen dieser Arbeit auch die noch relativ junge Technik der Differential Dynamic Microscopy (siehe Unterkap. 3.2.3) am SPIM-Aufbau implementiert und getestet. Eine erste erfolgreiche Realisierung dieser Technik in einem Lichtblattmikroskops wurde bereits während der Erstellung dieser Arbeit publiziert [117]. Ein wertvoller Vorteil dieser Methode im Vergleich zur SPT-Technik ist die Möglichkeit, den Diffusionskoeffizient diffundierender Teilchen auch bei hohen Konzentrationen, die eine Unterscheidbarkeit der Teilchen nicht mehr ermöglichen, zu bestimmen.

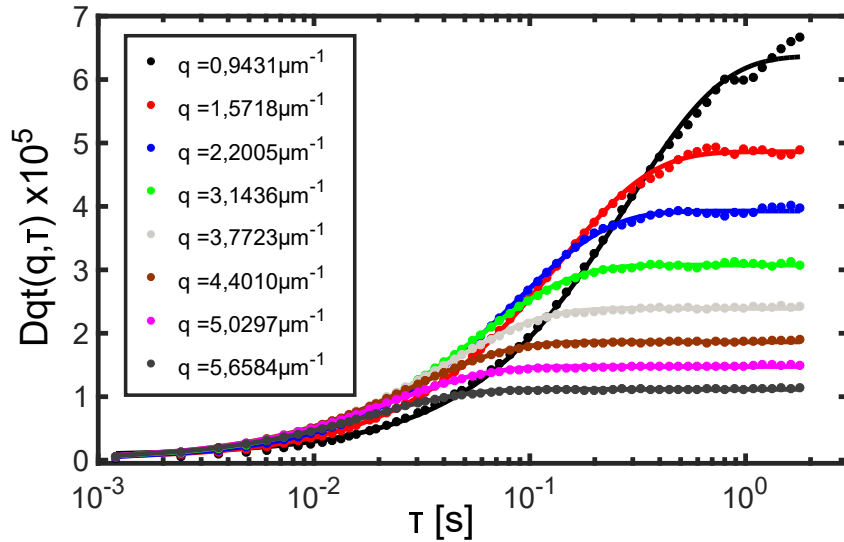
Die Probenaufnahme bei einer DDM-Messung ist vergleichbar zu SPIM-FCS-Messungen und SPT-Messungen. Grundlage bildet die konsekutive Langzeitaufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln. Nachfolgend sind spezifische Anforderungen an DDM-Messungen für eine stabile Auswertung der Strukturfunktion  $Dqt(q, \tau)$  in Abhängigkeit des untersuchten Wellenvektorbereich  $q$  beschrieben. Der grundsätzlich zur Verfügung stehende Bereich an Wellenvektoren ist zum einen gegeben durch die räumlichen Dimensionen der verwendeten Aufnahmen, im einzelnen der Pixelabstand  $x_{\min}$  und die Abmessung der quadratischen ROI, mit der Kantenlänge  $x_{\max}$ . Hieraus folgt der maximale  $q$ -Wert von  $q_{\max} = \pi/x_{\min}$  und ein minimaler  $q$ -Wert gemäß  $q_{\min} = 2\pi/x_{\max}$ . Um den Anstieg des Leistungsspektrums auf ein Plateau in der Messung noch erfassen zu können, werden zur Auswertung kleiner  $q$ -Werte entsprechend lange Messdauern  $T$  benötigt, mit  $T > 1/(D \cdot q_{\min}^2)$ . Große Wellenvektoren erfordern Messungen mit sehr kurzen Zeitabständen zwischen den Einzelaufnahmen, um dort den initialen Anstieg des Leistungsspektrums noch auflösen zu können. Hierfür wird eine Bildaufnahmerate  $F > D \cdot q_{\max}^2$  benötigt.



**Abb. 6.16:** Beispiele der Strukturfunktion  $Dqt(q_{x,y}, \tau)$  sowie der radial gemittelten Strukturfunktion  $D(q, \tau)$  einer Beads-Messung für unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  (A) Der Logarithmus der Strukturfunktion  $Dqt(q_{x,y}, \tau)$  ist im Wellenvektorraum  $q_{x,y}$  nach der Mittelung über alle Instanzen der Zeitabstände gezeigt. In der Nähe der beiden Mittellinien  $q_{x,y} = 0$  sind Artefakte zu erkennen, die aus der räumlichen Begrenzung der ROI stammen. Diese können bei Bedarf unterdrückt werden. Die Strukturfunktion zeigt eine annähernd radialsymmetrische Verteilung mit anwachsenden Werten bei größeren Zeitabständen, die den Anstieg der Varianz der Bildaufnahmen widerspiegeln. (B) Exemplarische Kurven der radial gemittelten Strukturfunktion zeigen den generellen Abfall der Strukturfunktion bei großen Wellenvektoren. Die Werte der Strukturfunktion steigen mit größeren Zeitabständen  $\tau$ . (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

Dies führt in DDM-Messungen zu einer weiteren Einschränkung des messbaren  $q$ -Bereichs, sowohl durch die räumliche Größe und Auflösung der Aufnahme, als auch durch die Bildaufnahmezeit  $F$  und die Messdauer  $T$ . Die Aufnahmeparameter der Messungen an Beads-Lösungen (Durchmesser  $d = 200\text{nm}$ ,  $D_{theo} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ), die für die hier vorgestellten DDM-Auswertungen verwendet wurden, sind identisch zu denen in den Unterkap. 6.1 und 6.2.

Die Auswertung der DDM-Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit erfolgt in mehreren Schritten innerhalb einer *Matlab*-basierten Softwareumgebung. Zunächst werden die einzelnen Bildreihen geladen und die Strukturfunktion  $Dqt(q, t)$  berechnet. Dieser Teil der Datenauswertung basiert auf einem modifiziertem Skript der Software *DDMCalc* [158]. Hierfür werden alle Einzelaufnahmen  $I(x, y, t)$  für einen gewählten Zeitabstand  $\tau$  voneinander subtrahiert, das Differenzbild  $\Delta I(x, y, \tau) = I(x, y, t + \tau) - I(x, y, t)$  über eine **FFT** (*Fast-Fourier-Transformation*) nach Gl. 3.36 in den Wellenvektorraum transformiert und die dreidimensionale Strukturfunktion  $Dqt(q_{x,y}, \tau)$  nach Gl. 3.37 berechnet. Zur Beschleunigung der Auswertung, insbesondere bei einer hohen Pixelanzahl und langen Messreihen, wird dies für eine Abfolge an exponentiell wachsenden Zeitabständen durchgeführt, um die Rechenzeit von Stunden auf mehrere Minuten zu reduzieren. So werden z.B. aus 20000 konsekutiven Einzelaufnahmen nur 86 unterschiedliche Zeitabstände ausgewertet. Abschließend wird das Ensemblemittel über alle Instanzen des Zeitabstandes  $\tau$  gebildet. Beispiele der so erhaltenen Strukturfunktion  $Dqt(q_{x,y}, \tau)$  aus einer Messung an einer Beads-Probe sind in Abb. 6.16 A für vier unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  zu sehen. Die Strukturfunktion selbst zeigt eine weitgehend radialsymmetrische Verteilung um den Mittelpunkt der kleinsten Wellenvektoren, sowie eine Entwicklung zu höheren Werten der Strukturfunktion für größere Zeitabstände aufgrund der anwachsenden Varianz der Aufnahmen. Unter der Annahme einer räumlich homogenen Diffusion der Probe kann nun eine Mittelung



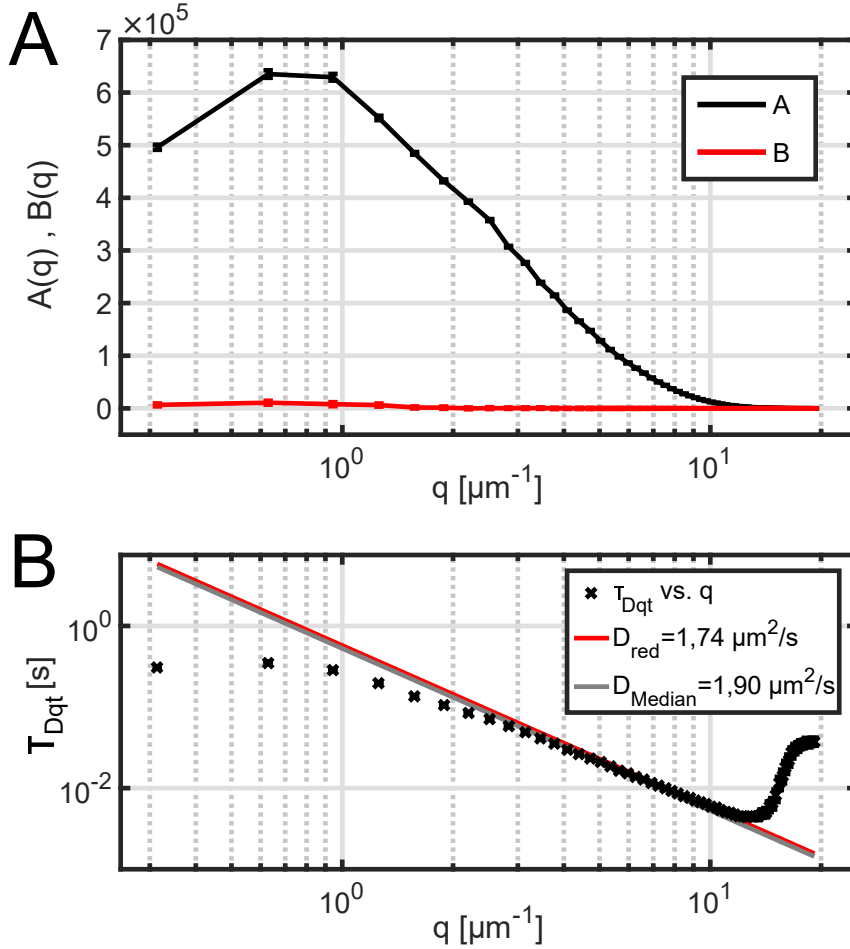
**Abb. 6.17: Kurven der Strukturfunktion  $Dqt(q, \tau)$  aufgetragen nach  $\tau$  mit Fit**

Gezeigt sind Datensätze der Strukturfunktion  $Dqt(q, \tau)$  der Messung aus Abb. 6.16 aufgetragen gegen die Zeitabstände  $\tau$  für unterschiedliche Wellenvektoren  $q$ . Der Anstieg der Strukturfunktionen wird von einem Fit nach Gl. 3.38 erfasst und dient zur Bestimmung der wellenvektorabhängigen Zeitskala  $\tau_{Dqt}$ . Die Länge der erfassten Zeitabstände reicht aus, um das Plateau der Strukturfunktion für Wellenvektoren bis ca.  $1 \mu\text{m}^{-1}$  verlässlich zu fiten. (*Bead-Größe* 200nm, *Konzentration* 0,004%, *Zeitabstand* 1,208ms, *Bildanzahl* 20000, *Pixelgröße* 162,5nm, *ROI-Größe*  $124 \times 124$  Pixel)

nach  $q = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$  durchgeführt und so die radial gemittelte Strukturfunktion  $Dqt(q, \tau)$  berechnet werden. Beispiele der so erhaltenen Kurven der Strukturfunktion für vier unterschiedliche Zeitabstände  $\tau$  sind in Abb. 6.16 B gezeigt.

Nach der Berechnung der Strukturfunktion wird diese innerhalb der Auswertesoftware für alle vorkommenden Wellenvektoren  $q$  nach Gl. 3.38 gefittet. Die Strukturfunktion für größere Zeitabstände  $\tau$  kann aufgrund der dort schlechteren Statistik Abweichungen aufweisen, was die Reduktion der Datenkurven auf kleinere Zeitabstände bisweilen nötig macht. Innerhalb der nachfolgend behandelten Auswertungen wurden hierbei aufgrund der geringeren Statistik für größere Zeitabstände nur Werte für  $\tau < 1,8\text{s}$  berücksichtigt. Beispiele der erhaltenen Kurven der Strukturfunktion für acht unterschiedliche Wellenvektoren mit zugehörigem Fit sind in Abb. 6.17 gezeigt. Die Kurven zeigen den Anstieg der Bildvarianz im Wellenvektorraum auf ein Plateau innerhalb einer bestimmten Zeitskala, in der jegliche Korrelation zwischen den Bildern abgeklungen ist.

Die Ergebnisse der Fit-Routine für die Fit-Parameter  $A(q)$  und  $B(q)$  sind in Abb. 6.18 A mit einem Fehler gemäß der Konfidenzintervalle des Fits bei einem Konfidenzniveau von 95% dargestellt. Der Verlauf der beiden Parameter entspricht dem beschriebenen Verhalten aus früheren DDM-Studien [113, 159] und zeigt eine starke Annäherung der Werte bei Wellenvektoren  $q > 10\mu\text{m}^{-1}$ . Ebenso lassen sich aus dem Fit die für die weitere Auswertung relevanten Daten der Zeitskalen  $\tau_{Dqt}(q)$  gegen die gemessenen Wellenvektoren  $q$  auftragen (siehe Abb. 6.18 B). Hier ist bereits zu erkennen, dass die Zeitskalen bei sehr kleinen Werten  $q < 1\mu\text{m}^{-1}$  und sehr großen Werten  $q > 10\mu\text{m}^{-1}$  vom erwarteten Verlauf  $\tau_{Dqt} = (Dq^2)^{-1}$  stark abweichen, welcher sich nur in einem Bereich mittlerer Wellenvektoren abzeichnet. Während bei sehr großen  $q$ -Werten ein Anstieg der beobachteten Zeitskala auftritt, nehmen diese bei sehr kleinen Wellenvektoren wieder ab. Dies wurde bereits in früheren DDM-Studien berichtet, wo Abweichungen bei großen Wellenvektoren zum einen auf die zu niedrige Zeitauflösung der Strukturfunktion und den Problemen der Fit-Routine bei zu ähnlichen Werten der Fit-Parameter  $A(q)$  und  $B(q)$  sowie auf eine Unterdrückung der hohen räumlichen Frequenzen der Bildaufnahmen durch die optische Transferfunktion der Detektion zurückgeführt wurde [117, 159, 160]. Dies scheint auch insofern erwartbar, da bei Wellenvektoren  $q > 10\mu\text{m}^{-1}$  bereits Abstände nahe der Größenordnung der Auflösungsgrenze des optischen Systems untersucht werden. Abweichungen bei niedrigen Werten des Wellenvektors lassen sich zum einen durch die erniedrigte Statistik der dort untersuchten großen räumlichen Abstände in den Aufnahmen, als auch durch die endliche Länge der Zeitaufnahme und die so limitierte zeitliche Abtastung der Strukturfunktion erklären [117, 159, 160]. Darüber hinaus spielt hierbei auch in besonderem Maße die axiale Auflösung des Systems eine Rolle, da eine von der in Unterkap. 3.2.3 beschriebenen Theorie vernachlässigte Diffusion in der axialen Richtung, also aus der Aufnahmeebene heraus, gerade bei kleinen Wellenvektoren zu einer Erniedrigung des gemessenen Wertes von  $\tau_{Dqt}$  führen würde [113, 116, 118]. Der gezeigte Verlauf der Zeitskalen  $\tau_{Dqt}(q)$  gelangt für kleine Wellenvektoren auf ein Plateau bei  $\tau_{Dqt, \max} \approx 0,4\text{s}$ , was eine Limitierung der untersuchten Längenskala des diffusiven Verhaltens auf ca.  $\sqrt{\tau_{Dqt, \max} \cdot D_{\text{theo}}} = \sqrt{0,4\text{s} \cdot 2,15\mu\text{m}^2/\text{s}} = 0,93\mu\text{m}$  widerspiegelt. Dieser Wert liegt nur leicht unterhalb der in Unterkap. 4.3 berechneten axialen Auflösung bzw. Lichtblattdicke des verwendeten SPIM-Aufbaus. Eine entsprechender Abfall der Zeitskalen in Abhängigkeit zur axialen Auflösung des verwendeten Systems ist auch in einer früheren DDM-Studien unter Verwendung konfokaler Aufbauten beobachtet worden [116]. Ebenso wurde in einer früheren DDM-Studie mit einem Lichtblattmikroskop eine Abhängigkeit des für die Auswertung nutzbaren Bereiches an Wellenvektoren von der Position entlang des Lichtblattes festgestellt [117]. Hierbei zeigten Messposition an Stellen der Probe, in denen sich das Lichtblatt fern seiner Taille aufgeweitet hat, nutzbare Bereiche der Wellenvektoren, die zu kleineren Werten verschoben waren, was mit der dort schlechteren axialen Auflösung erklärt werden kann.

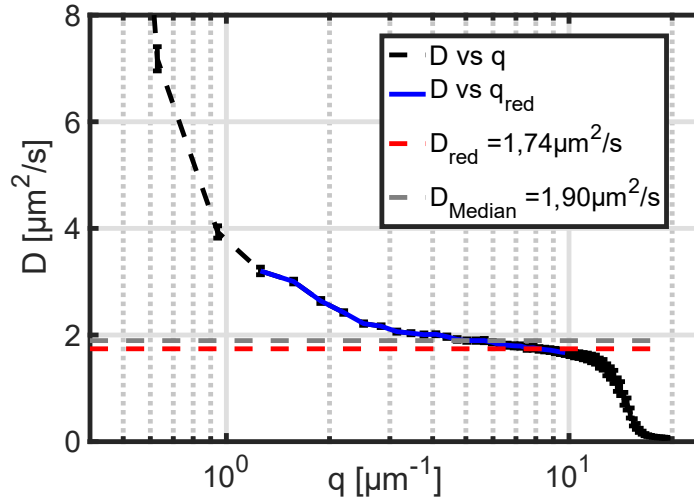


**Abb. 6.18: Kurven der Fit-Parameter A,B und Zeitskala  $\tau_{Dqt}$  gegen  $q$**

(A) Bei der Betrachtung der Fit-Parameter fällt zunächst eine deutliche Variation von  $A(q)$  über die unterschiedlichen Wellenvektoren  $q$  auf. Dieser nimmt zu großen Wellenvektoren stark ab und kommt für  $q$ -Werte  $> 10 \mu\text{m}^{-1}$  in Größenordnungen des Fit-Parameters des Hintergrundrauschens, was den Fit für diesen Bereich instabil werden lässt. (B) Die aus dem Fit an die Strukturfunktion bestimmte Zeitskala  $\tau_{Dqt}(q)$  zeigt in einem Bereich  $q = 1 - 10 \mu\text{m}^{-1}$  tendenziell den erwarteten Verlauf  $\tau(q) = (D_m q^2)^{-1}$ . Für kleinere Wellenvektoren ist ein starker Abfall gegenüber des erwarteten Verlaufs zu beobachten, der unter anderem auf der Diffusion der Teilchen aus der Fokalebene heraus basiert, welche die Zeitskala des Varianzanstiegs in diesem Bereich sichtbar erniedrigt. Hinzu kommt eine geringere Statistik an kleinen Wellenvektoren und eine endliche Zeitlänge der Bildaufnahme. Abweichungen bei großen Wellenvektoren hin zu erhöhten Zeitskalen sind zum einen auf die limitierende Aufnahmegeschwindigkeit um einen stabilen Fit sicherzustellen sowie die Begrenzung der Wellenvektoren durch die Auflösungsgrenze des optischen Systems zurückzuführen. Des Weiteren nähern sich hier die Werte der Fit-Parameter  $A(q)$  und  $B(q)$  in Gl. 3.38 zur gleichen Größenordnung hin an, was den Fit insgesamt instabil werden lässt. Ein Fit (rot) basierend auf einem reduzierten Wellenvektorbereich zwischen  $q = (1 - 10) \mu\text{m}^{-1}$  erfasst den Verlauf der Kurve weitgehend über diesen Bereich mit einem Diffusionskoeffizienten von  $D = (1,74 \pm 0,03) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Die Fehler der Zeitskalen aus den Konfidenzintervallen des Fits sind hierbei kleiner als die in der Abbildung verwendeten Symbole. Zudem ist der Medianwert (grau) der aus den einzelnen Zeitskalen des reduzierten Bereichs berechneten Diffusionskoeffizienten eingezeichnet. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)



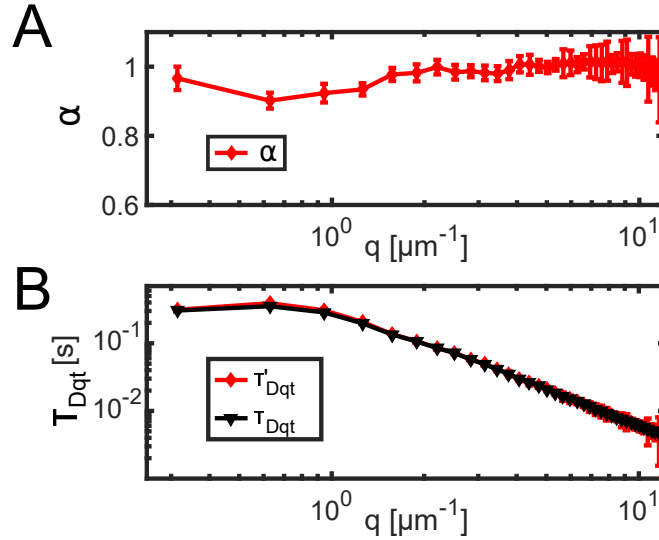
Eine weiterführende Behandlung dieses Einflusses unter Zuhilfenahme von Simulationen wird weiter unten vorgenommen. Durch eine Reduzierung des ausgewerteten Wellenvektorbereiches auf Werte zwischen  $q = (1 - 10)\mu\text{m}^{-1}$  kann nun eine Abschätzung des Diffusionskoeffizienten getätigt werden. Ein Fit an den inversen Werten von  $\tau$  gemäß  $\tau^{-1} = Dq^2$  basierend auf Gl. 3.39 führt zu einem Wert des Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{red}} = (1,74 \pm 0,03)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Hierbei wurde der inverse Wert von  $\tau$  gewählt, um hohen  $q$ -Werte aufgrund der erhöhten Statistik und der reduzierten Abhängigkeit von der axialen Auflösung entsprechend stärker zu gewichten. Eine andere Methode der Diffusionskoeffizientenbestimmung aus früheren Studien stellt die Berechnung des Mittelwerts des nach  $D(q) = q^{-2}\tau_{Dqt}^{-1}$  berechneten Diffusionskoeffizienten für einen reduzierten  $q$ -Bereich dar [117]. Dieser Methodik folgend wird zunächst der so berechnete Wert von  $D$  gegen  $q$  aufgetragen (siehe Abb. 6.19). Hierbei ist anzumerken, dass der Diffusionskoeffizient in der gezeigten Messung selbst innerhalb des reduzierten  $q$ -Bereichs einen deutlichen monotonen Anstieg für kleiner werdende  $q$ -Werte zeigt, was zu erhöhten Mittel- und Medianwerten von  $D_{\text{Mittelwert}} = (2,01 \pm 0,38)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Median}} = 1,90\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  im Vergleich zum obigem Fit-Ergebnis  $D_{\text{red}}$  führt.



**Abb. 6.19:** Diffusionskoeffizient nach Gl. 3.39 gegen  $q$

Der Graph der berechneten  $D(q)$ -Werte zeigt entsprechend des Verhaltens der Zeitskala  $\tau_{Dqt}$  einen starken Anstieg für kleiner werdende Wellenvektoren. Der Anstieg bleibt auch für den reduzierten Bereich  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$  (blau) deutlich erhalten. Horizontale Linien zeigen die Werte aus einem Fit an den reduzierten Bereich mit  $D_{\text{red}} = (1,74 \pm 0,03)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (rot), sowie den Medianwert der hierfür verwendeten Einzelwerte  $D_{\text{Median}} = 1,90\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (grau). (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

Unter der Annahme, dass eine Erhöhung des gemessenen Diffusionskoeffizienten aufgrund fehlender Statistik oder einer zu kurzen Aufnahmedauer erst bei niedrigeren Werten des Wellenvektors relevant wird, wäre ein weitgehend stabiler Wert des nach obiger Methode berechneten Diffusionskoeffizienten  $D(q)$  für höhere  $q$ -Werte im Bereich bis zu  $10\mu\text{m}^{-1}$  zu erwarten, was sich in der gezeigten Messung im Rahmen der Fehler nicht widerspiegelt. Dies spricht für einen wachsenden Einfluss der axialen Auflösung selbst bei hohen  $q$ -Werten. Zudem sollte die daraus folgende Überschätzung des Diffusionskoeffizienten nach  $D_{3D}(q) = q^{-2}\tau_{Dqt,3D}^{-1}(q)$  mit  $\tau_{Dqt,3D}(q) < \tau_{Dqt,2D}(q)$  zu einem zum realen Diffusionskoeffizient vergleichsweise erhöhten Wert führen. Der aus dem Fit für  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$  ermittelte Wert liegt hierbei unterhalb



**Abb. 6.20: Einfluss einer Agglomerat-Korrektur auf die Zeitskala  $\tau(q)$**

(A) Die Verwendung einer korrigierten Fit-Funktion an den Werten der Strukturfunktionen nach Gl. 6.3 führt zu Werten der Korrekturfaktoren  $\alpha$  für kleine Wellenvektoren zu Werten  $< 1$ . Innerhalb des für den Fit verwendeten Bereichs von  $q_{\text{red}} = [1 - 10 \mu\text{m}^{-1}]$  ist die gefittete Funktion mit einem Mittelwert von  $\alpha = 0,999 \pm 0,018$  im Rahmen der Fehler identisch zur unkorrigierten Fit-Formel. Für größere  $q$ -Werte wird der Fit wie oben beschrieben instabil. (B) Die Werte der korrigierten Zeitskalen  $\tau'_{Dqt}$  weichen nur für sehr geringe Werte des Wellenvektors von den Werten einer unkorrigierten Fit-Funktion ab und ändern den erhaltenen Wert der Diffusionskoeffizienten im Rahmen der Fehler nicht. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,004%, Zeitabstand 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  Pixel)

des theoretisch erwarteten und der aus SPIM-FCS- und SPT-Messungen ermittelten Werte. Dies könnte zu Teilen auf einen für DDM-Messungen potentiell verstärkten Einfluss agglomerierter Beads zurückzuführen sein. Auswertungen unterschiedlicher Messungen zeigen zudem bisweilen ein gewisse Variation des Verlaufs von  $D(q)$  für den Bereich  $q = [5 - 10 \mu\text{m}^{-1}]$  mit einem tendenziell weitgehend konstantem Verhalten für  $D(q)$  oder zwischenzeitliche niedrigeren Werte für  $D(q)$  im Bereich mittlerer  $q$ -Werte. Exemplarische Darstellungen dieser Verläufe finden sich im Anhang in Abb. A.1. Für eine Abschätzung des Diffusionskoeffizienten aus der DDM-Auswertung werden im weiteren Verlauf die Fit-Ergebnisse sowie die Medianwerte der Diffusionskoeffizienten angegeben, da die Mittelwerte zu stark von den erhöhten Werten der Diffusionskoeffizienten bei kleineren Wellenvektoren abhängen.

### Korrektur von Agglomeraten

Zur Korrektur eines möglichen Einflusses von Agglomeraten bei einer vermuteten Polydispersität der diffundierenden Teilchen wurde in früheren DDM-Studien eine Streckung des exponentiellen Anstiegs mittels eines zusätzlichen Fitparameters  $\alpha$  nach

$$D_{qt}(q, \tau) = A(q) \cdot \left[ 1 - e^{\left( -\frac{\tau}{\tau_{Dqt}(q)} \right)^{\alpha(q)}} \right] + B(q) \quad (6.3)$$

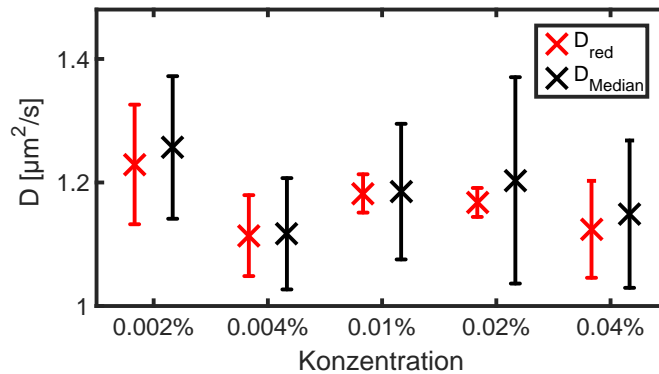
verwendet [117]. Dies erfordert vor der Auswertung des Diffusionskoeffizienten die Berechnung einer gemittelten Zeitskala  $\tau'_{Dqt}$  nach

$$\tau'_{Dqt} = \tau_{Dqt} \alpha \Gamma(\alpha^{-1}) \quad (6.4)$$

mit der Gammafunktion  $\Gamma$  und einem Korrekturfaktor  $\alpha$ . Eine Anwendung dieser Korrektur auf den oben behandelten Datensatz ist in Abb. 6.20 mit den erhaltenen Werten von  $\alpha(q)$  und den korrigierten und unkorrigierten Zeitskalen  $\tau_{Dqt}$  und  $\tau'_{Dqt}$  gezeigt. Der Effekt der Korrektur ist am größten im Bereich kleiner Wellenvektoren  $< 2\mu\text{m}^{-1}$  und führt dort mit  $\alpha$ -Werten von minimal 0,9 zu einer nur geringen Erhöhung der beobachteten Zeitskala. Der durch den Fit ermittelte Diffusionskoeffizient für  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$  liegt mit  $D'_{\text{red}} = (1,75 \pm 0,02)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  im Rahmen der Fehler bei identischen Werten im Vergleich zum unkorrigierten Datensatz mit  $D_{\text{red}} = (1,74 \pm 0,03)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ , da der Effekt der Korrektur vorrangig bei sehr kleinen Werten  $q < 1\mu\text{m}^{-1}$  zu Werten mit  $\alpha < 1$  führt. Dies zeigte sich auch für alle weiteren DDM-Messungen mit Abweichungen der korrigierten Ergebnisse um  $\pm(0,042 \pm 0,048)\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Im weiteren Rahmen der Auswertung wurde insofern auf eine Verwendung dieser Korrektur verzichtet.

### Ergebnisse für unterschiedliche Bead-Konzentrationen

Die Ergebnisse der Messungen an unterschiedlichen Konzentrationen von Beads zeigte innerhalb der DDM-Auswertungen keine ausgeprägte Abhängigkeit der ermittelten Diffusionskoeffizienten von der Konzentration. Abb. 6.21 und Tab. 4 zeigen die Mittelwerte der Diffusionskoeffizienten aus mehreren Messungen, die sich zum einen aus einem Fit an einem reduzierten Wellenvektorbereich  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$  ergeben und zum anderen aus den Medianwerten der nach  $D(q) = q^{-2}\tau_{Dqt}^{-1}$  berechneten Einzelwerte dieses Bereichs bestimmt wurden. Im Rahmen der Standardabweichungen der Messungen sind diese Werte weithin vergleichbar, mit einer leichten Erhöhung der Medianwerte im Vergleich zu den Fit-Ergebnissen, sowie einer breiteren Streuung der Medianwerte. Die innerhalb der DDM-Auswertung bestimmten Werte der Diffusionskoeffizienten zeigen über alle Messungen erniedrigte Werte im Vergleich zum theoretisch erwarteten Wert  $D_{\text{theo}} = 2,15\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  sowie zu den Ergebnissen aus SPIM-FCS- und SPT-Messungen (siehe



**Abb. 6.21: Resultate der DDM-Auswertungen für unterschiedliche Bead-Konzentrationen**

Gezeigt sind die gemittelten Ergebnisse der DDM-Auswertungen aus einem Fit an einem reduzierten Bereich an Wellenvektoren (rot) mit  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$ , sowie die Medianwerte der Diffusionskoeffizienten (schwarz) in diesem Bereich (vgl. Abb. 6.19). Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Die gemessenen Werte liegen im Bereich  $D = 1,31 - 1,74\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und damit unterhalb des theoretisch erwarteten Wertes und der Ergebnisse aus SPIM-FCS- und SPT-Messungen. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,002 – 0,04%, Zeitabstand 0,624 – 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124 - 248 \times 248$  Pixel)

Unterkap. 6.1 und 6.2). Eine potentielle Auswirkung von Agglomeraten innerhalb der Messungen, die zu einer Erniedrigung des gemessenen Diffusionskoeffizienten führen würde, konnte anhand der oben beschriebenen Korrekturmethode nicht bestätigt werden. Zudem sollte eine Überschätzung des Diffusionskoeffizienten aufgrund der in der Theorie nicht berücksichtigten Diffusion aus der Detektionsebene heraus zu tendenziell erhöhten Werten führen.

Vergleichbare DDM-Messungen einer anderen Gruppe an 200nm-Beads in einem SPIM-Aufbau ergeben einen Diffusionskoeffizienten von  $(2,28 \pm 0,03) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  für eine Konzentration von 0,04% [117], was um fast einen Faktor 2 größer ist im Vergleich zu Messungen dieser Arbeit. Neben der Verwendung eines dickeren Lichtblatt (Halbwertsbreite  $\sim 4,5\mu\text{m}$ ), eines Detektionsobjektiv mit geringerer Auflösung ( $20\times$ ) und niedrigerer Numerischer Apertur (0,5), was zu einer Erniedrigung des Einflusses einer Diffusion aus der Aufnahmeebene heraus führt, wird innerhalb der erwähnten Studie insbesondere der Mittelwert der Einzelwerte des Diffusionskoeffizienten in einem reduzierten  $q$ -Bereich verwendet. Dies ermöglicht ohne genaue Kenntnis der Kurvenverläufe  $D(q)$  aus dieser Studie keinen direkten Vergleich mit den hier gezeigten Ergebnissen.

Konzentration:	0,002%	0,004%	0,01%	0,02%	0,04%
$D_{\text{red}} [\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$	$1,57 \pm 0,24$	$1,29 \pm 0,16$	$1,46 \pm 0,08$	$1,42 \pm 0,06$	$1,31 \pm 0,20$
$D_{\text{Median}} [\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$	$1,64 \pm 0,29$	$1,29 \pm 0,23$	$1,46 \pm 0,27$	$1,51 \pm 0,42$	$1,37 \pm 0,30$

**Tab. 4: Resultate der DDM-Auswertungen für unterschiedliche Bead-Konzentrationen**  
Gelistet sind die Mittelwerte der gemessenen Werte  $D_{\text{red}}$  aus einem Fit für  $q_{\text{red}} = [1 - 10\mu\text{m}^{-1}]$  und der Medianwerte im ausgewählten  $q$ -Bereich mit den jeweiligen Standardabweichungen. (Bead-Größe 200nm, Konzentration 0,002 – 0,04%, Zeitabstand 0,624 – 1,208ms, Bildanzahl 20000, Pixelgröße 162,5nm, ROI-Größe  $124 \times 124$  -  $248 \times 248$  Pixel)

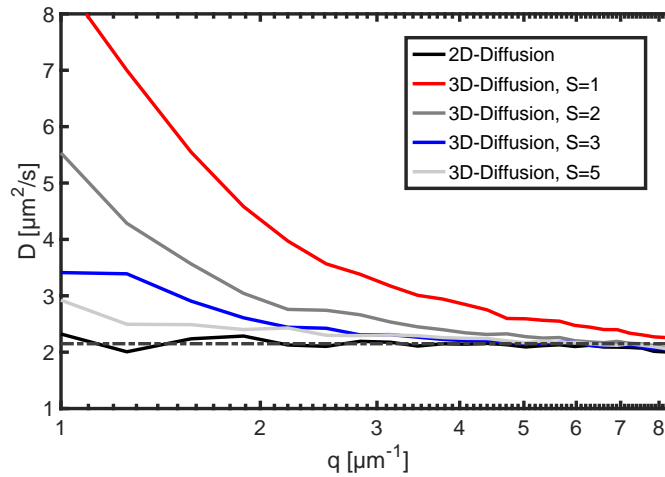
### Simulationen und Einfluss der Lichtblattdicke

Zur Untersuchung des Einflusses der axialen Auflösung auf die DDM-Messung erfolgt die Auswertung simulierter Datensätze. Hierfür wurde in *Matlab* eine am Lehrstuhl bereits vorhandene Simulationssoftware von Herrn Prof. Dr. Matthias Weiss für zweidimensionale Diffusion durch den Verfasser dieser Arbeit auf drei Dimensionen erweitert und entsprechend der obigen Methodik ausgewertet. Die Parameter der Simulation werden hierbei soweit möglich identisch zu den realen Experimenten gewählt und sind wie folgt:

- Zeitabstand 1208 $\mu\text{s}$
- Pixelgröße: 162,5nm
- Teilchenanzahl: 20
- ROI: (124x124) Pixel
- 20.000 Einzelaufnahmen
- Diffusionskoeffizient der Teilchen  $D = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$
- Auflösung in x/y:  $\sigma_{\text{det},xy} = 500\text{nm}$
- Axiale Auflösung in z:  $\sigma_{\text{det},z} = S \cdot 500\text{nm}$

Der Parameter  $S = \sigma_{\text{det},z}/\sigma_{\text{det},xy}$  gibt hierbei als Strukturfaktor die Anisotropie der Auflösung an. Für die oben gezeigten experimentellen Messdaten beträgt  $S$  hierbei ca.  $S_{\text{exp}} = 2,6$ . Innerhalb der Simulation werden die Teilchen zunächst beliebig verteilt und können zwischen

den einzelnen Aufnahmen in allen drei Raumdimensionen stochastisch eine brownische Bewegung gemäß ihres Diffusionskoeffizienten nach  $r_{x,y,z}(t + \tau) = r_{x,y,z}(t) + r_{\text{diff}}$  durchführen.  $r_{\text{diff}}$  steht hierbei für eine normalverteilte Zufallsvariable gemäß einer Verteilung um 0 und mit einer Standardabweichung von  $\sqrt{2D\tau}$  in den drei Raumdimensionen. Zur Berechnung der Aufnahme wird das Bild zunächst mit einem stochastischem Rauschen gefüllt und die Beiträge der einzelnen Partikel durch eine Gaußfunktion mit einer Halbwertsbreite entsprechend der Auflösungen verrechnet. Die Partikel können aus den Rändern der  $xy$ -Koordinaten hinaus diffundieren und werden durch neue Partikel an einer Randposition ersetzt. Für Partikelpositionen in  $z > \pm 3 \cdot S \cdot 500\text{nm}$ , weit nachdem die Intensitätsbeiträge der Partikel unterhalb des Rauschniveaus liegen, werden diese durch eine neu gewählte Partikelposition an dem Rand des  $z$ -Bereichs ersetzt. Die so erhaltenen simulierten Aufnahmen werden als Bilddateien abgespeichert und in einem weiteren Schritt identisch zu realen Messdaten nach dem oben beschriebenen Prozedere ausgewertet.



**Abb. 6.22: Einfluss der axialen Auflösung in simulierten DDM-Messungen**

Gezeigt sind die aus simulierten Datensätzen gewonnenen Verläufe für  $D(q)$  für eine zweidimensionale Diffusion und eine dreidimensionale Diffusion mit unterschiedlichen Werten der Anisotropie der Auflösung  $S = \sigma_{\text{det},z}/\sigma_{\text{det},xy}$ . Simulierter Datensätze einer zweidimensionalen Diffusion (schwarz) zeigen den erwarteten Verlauf eines weitgehend konstanten Wertes des Diffusionskoeffizienten um den in der Simulation verwendeten Wert von  $D = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (graue Linie). Datensätze dreidimensionaler Diffusion zeigen eine von  $S$  abhängige Überschätzung der Diffusionskoeffizienten für kleine Wellenvektoren, die für größere Werte der axialen Auflösung entsprechend abnimmt.

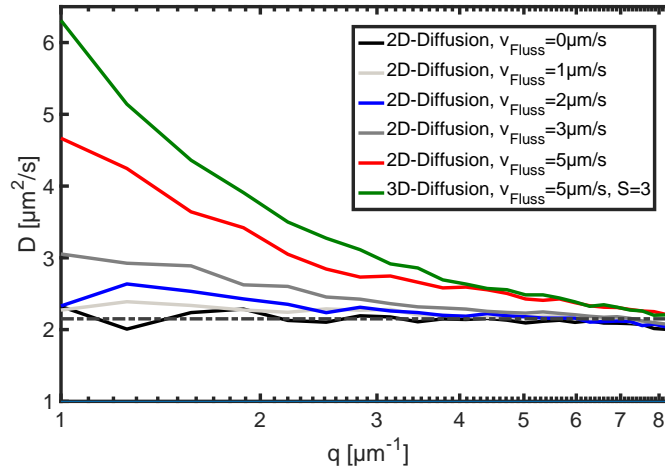
Beispiele der Verläufe von  $D(q)$  für einen reduzierten Bereich an Wellenvektoren, in dem der Fit an den simulierten Datensätzen zu stabilen Ergebnissen führte, sind in Abb. 6.22 gezeigt. Hierbei wurden zum einen eine zweidimensionale Diffusion (keine Bewegung in  $z$ ) sowie Datensätze für eine dreidimensionale Diffusion mit unterschiedlichen Werten der axialen Auflösung aufgetragen. Zunächst zeigt sich, dass die Auswertung einer zweidimensionalen Diffusion erwartungsgemäß zu einem stabilen Verlauf  $D(q)$  um den in der Simulation verwendeten Wert des Diffusionskoeffizienten von  $D = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  führt. Dies verifiziert auch die grundlegende Methodik der DDM-Auswertung, die in dieser Arbeit verwendet wird. Für eine isotrope Auflösung mit  $S = 1$  zeigt sich eine starke Abhängigkeit von  $D(q)$  mit der erwarteten Überschätzung des Diffusionskoeffizienten bei kleineren Werten des Wellenvektors. Der Einfluss der Diffusion nimmt für eine größer werdende Anisotropie der Auflösung aufgrund des abnehmenden Einflusses

ses der Diffusion in  $z$  erwartungsgemäß ab. Experimentelle Datensätze aus DDM-Messungen am zweiten SPIM-Aufbau für unterschiedliche Lichtblatttdicken im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Lukas Weihmayr [137] bestätigen die gezeigten Ergebnisse der Simulationen. Der Einfluss einer axialen Komponente der Diffusion in DDM-Messungen wurde bereits in früheren Publikationen angesprochen [113, 116, 118]. Indem in der Strukturfunktion

$$Dqt(q, \tau) = A(q) \cdot [1 - g(q, \tau)] + B(q) \quad (6.5)$$

mit der normierten Korrelationsfunktion  $g(q, \tau)$  die einzelnen Beiträge der lateralen und axialen Diffusion nach  $g(q, \tau) = g_{2D}(q, \tau) \cdot g_z(q, \tau)$  berücksichtigt werden, können DDM-Messungen so theoretisch auch zur Bestimmung dreidimensionaler Diffusion verwendet werden. Während die Korrelationsfunktion der lateralen Beiträge die zuvor bereits verwendete Form  $g_{2D}(q, \tau) = e^{-Dq_{xy}^2\tau}$  besitzt, ist der Beitrag in axialer Richtung nach [113] in einem Hellfeldmikroskop abhängig von der Kohärenz der verwendeten Ausleuchtung. Während hier für den Grenzfall eine kohärente Ausleuchtung eine Relation gemäß  $g_z(q, \tau) \sim e^{-Dq_z^2\tau}$  zustande kommt, führt eine inkohärente Ausleuchtung zu einer Abhängigkeit der Form  $g_z(q, \tau) \sim 1/\sqrt{1 + D\Delta q^2\tau}$  mit einer charakteristischen Breite  $\Delta q$  der optischen Transferfunktion in  $z$ . Diese kann als inverser Wert der Schärfentiefe  $L(q) = 1/\Delta q$  verstanden werden. Diese theoretische Überlegung führt in der Literatur zu der entsprechenden Empfehlung einer Verwendung eines optischen Systems mit einem hohen Wert der Schärfentiefe bzw. einer Detektionsoptik mit einer niedrigen numerischen Apertur. Dies resultiert innerhalb der DDM-Messungen zu einer Zeitskala der Beiträge axialer Diffusion, die vernachlässigbar groß gegenüber der Zeitskala des Anstiegs der Strukturfunktion aufgrund der lateralen Diffusion bleiben.

Eine Implementierung obiger Überlegungen zum Beitrag der axialen Diffusion im Rahmen einer tatsächlichen Auswertung an Messungen dreidimensionaler Diffusion wurde nach dem Kenntnisstand des Autors dieser Arbeit bisher nicht beschrieben bzw. publiziert und stellt eines der



**Abb. 6.23: Einfluss einer gerichteten Strömung in simulierten DDM-Messungen**

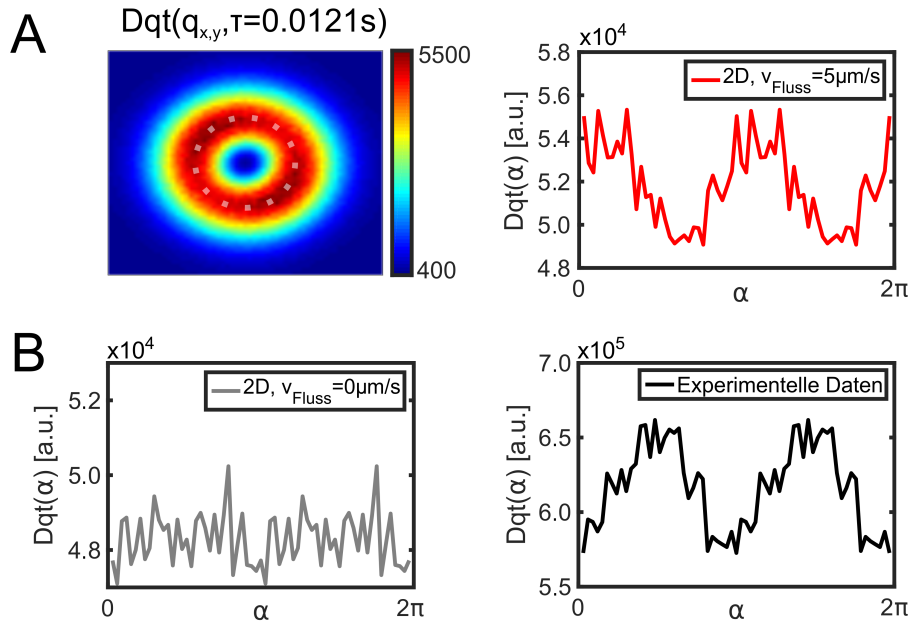
Die Werte der Diffusionskoeffizienten aus azimuthal gemittelten simulierten Datensätzen zweidimensionaler Diffusion mit einer gerichteten Strömung zeigen eine für stärkere Strömungsgeschwindigkeiten  $v_{\text{Fluss}}$  zunehmende Überschätzung der Diffusionskoeffizienten für kleiner werdende Wellenvektoren. Eine Erweiterung auf dreidimensionale Diffusion mit ausgeprägter Strömung führt zu einer entsprechenden stärkeren Überschätzung des Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu einer zweidimensionalen Strömung bzw. einer dreidimensionalen Diffusion ohne Strömung (vgl. Abb. 6.22).

potentiellen künftigen Projekte basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Grundlagen dar.

### Einfluss einer gerichteten Strömung auf DDM-Messungen

Der Einfluss einer gerichteten Strömung innerhalb der Probe sollte neben dem Effekt der brownischen Diffusion zu einer entsprechenden Erniedrigung der Zeitskala des Varianzanstiegs und damit zu einer Überschätzung des Diffusionskoeffizienten führen. Um dies an simulierten Datensätzen zu testen wurden mehrere Szenarien zweidimensionaler Diffusion mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten  $\vec{v}_{\text{Fluss}}$  nach  $\vec{r}_{x,y,z}(t + \tau) = \vec{r}_{x,y,z}(t) + \vec{r}_{\text{diff}} + \vec{v}_{\text{Fluss}}\tau$  simuliert. Die aus den DDM-Auswertungen resultierenden Verläufe für  $D(q)$  sind in Abb. 6.23 gezeigt. Die Kurvenverläufe zeigen deutlich die erwartete Überschätzung der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit zur Flussgeschwindigkeit. Diese wächst für kleiner werdende Wellenvektoren vergleichbar zur Überschätzung des Diffusionskoeffizienten aufgrund einer axialen Diffusion an (siehe Abb. 6.22).

Datensätze mit einer Überlagerung der beiden Effekte zeigen dementsprechend auch eine stärker ausgeprägte Überschätzung von  $D(q)$  im Vergleich zu einer dreidimensionalen Diffusion ohne Fluss bzw. einer zweidimensionalen Diffusion mit Fluss. Der Einfluss einer gerichteten Strömung sollte sich zudem in den dreidimensionalen Datensätzen der Strukturfunktion  $Dqt(q_x, q_y, \tau)$  zeigen. Eine entsprechende Darstellung der dreidimensionalen Strukturfunktion  $Dqt(q_x, q_y, \tau)$  für



**Abb. 6.24: Einfluss einer gerichteten Strömung auf die Strukturfunktion**

(A) Die Darstellung der dreidimensionalen Strukturfunktion  $Dqt(q_x, q_y)$  für einen beliebig gewählten Zeitabstand  $\tau = 0,0121\text{s}$  zeigt für eine simulierte Messung mit einer gerichteten Strömung eine Abweichung von der theoretisch erwarteten Rotationssymmetrie einer isotropen Diffusion. Der rechts gezeigte Verlauf der Werte für  $Dqt$  für Werte des Wellenvektors bei  $q = \sqrt{q_x^2 + q_y^2} = 3,14\mu\text{m}^{-1}$  (gepunkteter Kreis in linker Abbildung) zeigt entlang des Kreisprofils eine deutliche Abweichung von einem konstanten Verlauf. (B) Vergleichbare Abbildung des Verlaufs der Strukturfunktion für einen simulierten Datensatz ohne Fluss zeigen im Rahmen der Fluktuationen einen gleichmäßigen Verlauf der Strukturfunktion. Die Auswertung eines experimentellen Datensatz mit Fluss zeigt vergleichbar zu Simulationen mit Fluss eine deutliche Variation der Strukturfunktion.

einen simulierten Datensatz mit  $v_{\text{Fluss}} = 5 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  ist in Abb. 6.24 A gezeigt. Durch die gerichtete Strömung ist die Annahme der Isotropie nicht mehr erfüllt und die Strukturfunktion zeigt eine richtungsabhängige Abhängigkeit der Werte entlang eines Kreisprofils eines festen Wertes  $q = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$ . Eine vergleichbare Kurve für einen simulierten Datensatz ohne Fluss (siehe Abb. 6.24 B) zeigt hingegen den erwarteten konstanten Verlauf von  $Dqt(q, \tau)$ , während die aus einem experimentellen Datensatz mit Fluss gewonnene Kurve ebenfalls eine deutliche Richtungsabhängigkeit aufweist. Die hier gezeigten Datensätze zeigen deutlich, dass die azimuthale Mittelung der Datensätze demnach für Messungen mit gerichteter Strömung eine fehlerbehaftete gemittelte Größe der Strukturfunktion  $Dqt(q, \tau)$  zur Folge hat. Stattdessen wäre eine richtungsabhängige Analyse aller Kurven der Strukturfunktion vonnöten, um den Fehler einer Überschätzung des Diffusionskoeffizienten zu vermeiden.

Eine Auswertung der Datensätze der Strukturfunktion entlang einer Ausrichtung orthogonal zur Flussrichtung ergibt hierbei eine korrekte Bestimmung des Diffusionskoeffizienten, vergleichbar zu den Datensätzen ohne Strömung. Die Strukturfunktionen entlang der Flussrichtung zeigen den zu erwartenden zusätzlichen Anstieg der Varianz aufgrund der gerichteten Bewegung und lässt sich dementsprechend nicht mehr durch Gl. 3.38 korrekt erfassen. Zur korrekten Auswertung dieser Datensätze bedarf es einer dementsprechend korrigierten Fit-Formel, die die Abweichungen von einer rein brownischen Bewegung beinhalten. Angepasste Fit-Funktionen zur Auswertung von DDM-Datensätzen wurden in der Vergangenheit beispielsweise bereits bei Messdaten verwendet, die eine Überlagerung ballistischer Bewegung mit brownischer Diffusion aufzeigten [116, 118, 161]. Aufgrund der Annahme einer Isotropie der hier untersuchten ballistischen Bewegungen der markierten Teilchen können hierbei jedoch wiederum azimuthal gemittelte Kurven von  $Dqt(q, \tau)$  verwendet werden. Eine Berücksichtigung einer gerichteten Strömung in vergleichbaren Streutechniken [162] führt zu einem Beitrag des Flusses auf die Korrelationsfunktion gemäß  $g_{\text{Fluss}} \sim e^{\tau^2/\tau_{\text{Fluss}}^2}$  mit einer charakteristischen Zeitskala des Flussbeitrags  $\tau_{\text{Fluss}}$ . Eine Fit-Funktion der Form

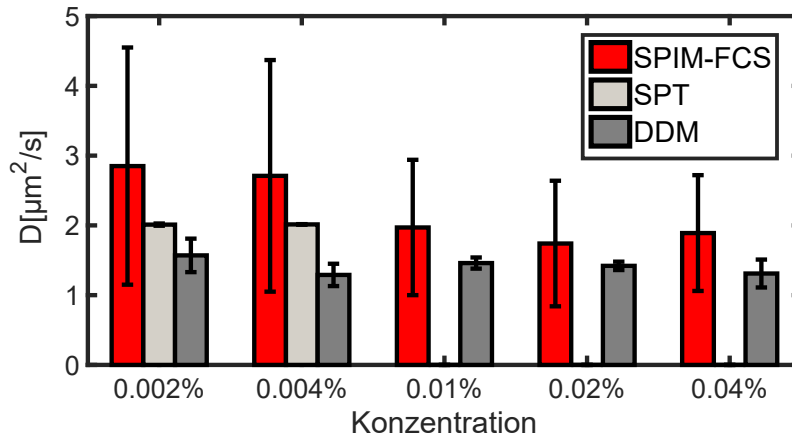
$$Dqt(q_{x,y}, \tau) = A(q) \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{Dqt}(q)}} e^{-\frac{\tau^2}{\tau_{\text{Fluss}}^2(q_{x,y})^2}} \right] + B(q) \quad (6.6)$$

könnte so zur Analyse einer gerichteten Strömung in DDM-Messungen herangezogen werden. Ein Versuch der Implementierung obiger Fit-Formel zur Flussgeschwindigkeitsbestimmung im Rahmen einer richtungsabhängigen Auswertung der Strukturfunktion wurde im Rahmen des Projekts bislang unterlassen und steht im Fokus weiterer zukünftiger Untersuchungen.



#### 6.4. Zusammenfassung, Vergleich und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Implementierung von drei unterschiedlichen Techniken zur Diffusionsmessung am zuvor vorgestellten Lichtblattmikroskop. Durch Messungen an Eichproben wurde der Arbeitsablauf zur Datenaufnahme und -auswertung sowie zu berücksichtigende Faktoren und die Behandlung von probenspezifischen Eigenschaften aufgezeigt. Hierbei traten charakteristische Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden ans Licht. Die Ergebnisse der Messungen an fluoreszierenden Partikeln in Lösung für unterschiedliche Konzentrationen sind gesammelt in Abb. 6.25 gezeigt.



**Abb. 6.25: Vergleich der Ergebnisse der Diffusionsmessungen an Beads**

Gezeigt sind die Ergebnisse der Diffusionsmessungen an 200nm Beads für unterschiedliche Konzentrationen mit unterschiedlichen Techniken zur Diffusionsmessung. Aufgrund der fehlenden Unterscheidbarkeit der Teilchen liegen hier für die SPT-Messungen keine Ergebnisse für Lösungen höherer Bead-Konzentration vor. Während SPIM-FCS- (rot) und SPT-Messungen (hellgrau) Ergebnisse im Bereich des theoretisch erwarteten Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{theo}} = 2,15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  liefern, ergeben DDM-Messungen (dunkelgrau) leicht erniedrigte Werte. Neben der in Unterkap. 6.1 beschriebenen Überschätzung des Diffusionskoeffizienten bei SPIM-FCS-Messungen an sehr niedrigen Teilchenkonzentrationen ist keine eindeutige Abhängigkeit des diffusiven Verhaltens von der Teilchenkonzentration im untersuchten Bereich festzustellen.

Die Ergebnisse der gezeigten SPIM-FCS-Messungen zeigten trotz einer breiten Verteilungen der extrahierten Diffusionskoeffizienten Mittelwerte der Messungen im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes. Durch eine unabhängige Auswertung aller einzelnen Pixelintensitätsverläufe besitzt diese Methode neben einer entsprechend hohen Statistik aufgrund der hohen Pixelanzahl auch die Möglichkeit einzelne Regionen bzw. fehlerhafte Pixel anhand unterschiedlicher Qualitätsparameter zu maskieren. Dies steigert insbesondere bei heterogenen Proben die Qualität der Ergebnisse. Potentielle Fehlerquellen, wie die Anwesenheit von Agglomeraten oder gerichteter Strömung, können im Rahmen der verwendeten Fit-Modelle entsprechend berücksichtigt werden. Allein bei zu niedrigen Konzentrationen der untersuchten diffundierenden Partikeln zeigte sich aufgrund der erniedrigten Partikelstatistik in den Observationsvolumen einzelner Pixel eine potentielle Überschätzung der gemessenen Diffusionskoeffizienten.

Die hier vorgestellten SPT-Messungen an Beads bestätigen die theoretisch erwarteten Werte der Diffusion für die untersuchten Proben, sowie die Ergebnisse der SPIM-FCS-Messungen. Die Notwendigkeit der Unterscheidbarkeit der einzelnen Partikel limitiert diese Methode jedoch auf niedrige Teilchenkonzentrationen. Durch eine Betrachtung des Ensemblemittels einer

entsprechend hohen Anzahl an Partikeltrajektorien kann hier eine stabile Auswertung des diffusen Verhaltens gewährleistet und probenspezifische Eigenschaften wie die einer gerichteten Strömung verlässlich bestimmt und korrigiert werden.

Die Implementierung von DDM-Messungen an dem vorgestellten Lichtblattmikroskop zeigte gerätespezifische Herausforderungen in der Auswertung der Datensätze. Aufgrund der hohen axialen Auflösung eines Lichtblattmikroskops führt die bisher für die Verwendung dieser Messmethode meist unberücksichtigte Diffusion in axialer Dimension zu einer wellenvektorabhängigen Überschätzung der Diffusionskoeffizienten. Auch die Auswirkungen eines potentiellen Flusses in der Probe zeigen hier die Grenzen der Methode auf, die zu einer notwendigen Anpassung der Auswerteroutine für derartige Messsituationen führt. Die Ergebnisse der hier gezeigten Auswertungen experimenteller Datensätze führen demnach nur zu bedingt mit den zuvor vorgestellten Methoden vergleichbaren Ergebnissen.

Weiterführende Projekte ausgehend von den hier gezeigten Messungen beinhalten zum einen den Einsatz der SPIM-FCS-Technik an biologischen Proben. Aufgrund der hier gegebenen Möglichkeit, parallelisierte Diffusionsmessungen in größeren Regionen heterogener Proben durchzuführen und in der Auswertung räumlich diskriminieren zu können, erlaubt diese Methode auch die Untersuchung komplexerer Diffusionsszenarien in der Umgebung von Zellen und Embryonen. Erste derartige Messungen werden im nachfolgenden Kapitel vorgestellt.

Zudem sind zukünftige Diffusionsstudien unter Verwendung der unterschiedlichen Techniken sowie eine Weiterentwicklung der hier vorgestellten DDM-Auswertung unter Berücksichtigung der Störgrößen Fluss und axialer Diffusion geplant.

Ein Vergleich der Anwendung der hier vorgestellten Techniken an einem Lichtblattmikroskop in Form einer Publikation befindet sich zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit in der Entstehung.

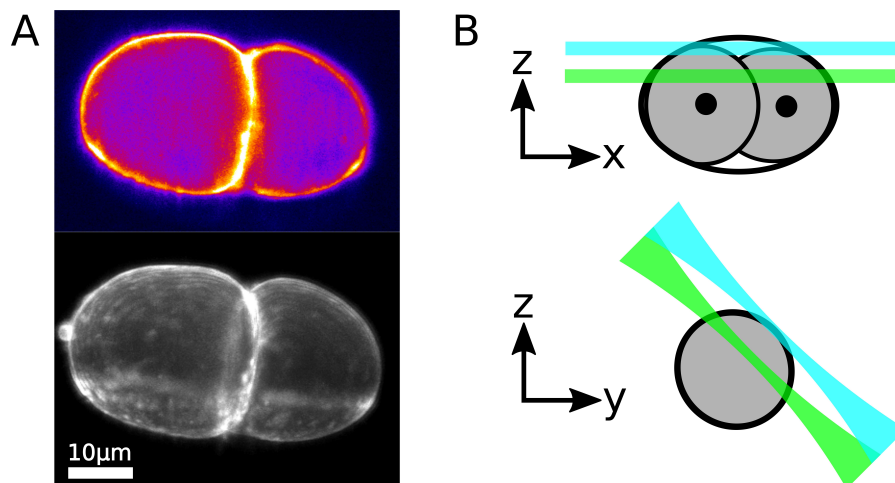
## 7. Diffusionsmessungen im frühen Wurmembryo mit SPIM-FCS

Nach der Durchführung erster Messungen an Eichproben besteht der nächste Schritt im Einsatz der SPIM-FCS-Technik an lebenden biologischen Systemen. Erste erfolgreiche SPIM-FCS-Messungen der Proteindiffusion in biologischen Proben wurden zumeist in Kulturzellen durchgeführt [101, 102, 104, 107]. Weitere Diffusionsmessungen, z.B. in der Flügelimaginalscheibe junger *Drosophila*-Embryonen [101] oder an Partikeln im Blutkreislauf eines Zebrafisch-Embryos [100], zeigen erste erfolgreiche Anwendungen in Embryonen als empfindlichen Modellsystemen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die erstmalige Durchführung von SPIM-FCS-Messungen im frühen Embryo des *C. elegans*. Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit publiziert [103]. Messungen und die Evaluation der Daten wurden, soweit nicht anders vermerkt, vom Autor dieser Arbeit getätigt.

### 7.1. Messungen am peripherem Membranprotein PLC1 $\delta$ 1

#### Zielsetzung und Motivation

Zur Überprüfung der Einsatzmöglichkeiten der SPIM-FCS-Technik in frühen Embryonen des *C. elegans* wird als erste Probe zunächst ein System gewählt, innerhalb dessen sowohl das Szenario einer dreidimensionalen Diffusion im Zytoplasma als auch einer zweidimensionalen Diffusion auf einer Membran untersucht werden kann. Hierfür geeignet scheint das periphere Membranprotein PLC1 $\delta$ 1, welches im *C. elegans*-Embryo aufgrund seiner Pleckstrinhomologiedomäne an die Zellmembran ankoppeln kann, wo es eine zweidimensionale Diffusion zeigt [163]. Des weiteren kann es sich nach einer typischen Aufenthaltszeit auf der Membran wieder von dieser lösen und liegt somit auch frei diffundierend im Zytoplasma der Zelle vor.



**Abb. 7.1: Probe und Position des Lichtblatts zur Diffusionsmessung in *C. elegans***

(A) Gezeigt sind eine Einzelaufnahme der Fluoreszenzintensität der Linie OD58 in einer Ebene, sowie darunter eine Maximalintensitätsprojektion einer Stackaufnahme. Man erkennt die erhöhte Proteinkonzentration an der Membran und den geringeren zytoplasmischen Anteil des markierten Proteins. (B) Die Lichtblatt- und Detektionsebene für SPIM-FCS-Messungen wird für Membranmessungen in die dem Detektionsobjektiv näher zugewandte Zellmembran gelegt (türkise Ebene). Diffusionsmessungen werden in einer Ebene in der oberen Hälfte des Embryos vorgenommen, um mögliche Aberrationen durch die Probe gering zu halten (grüne Ebene in rechter Abbildung). Abbildung nach [103]

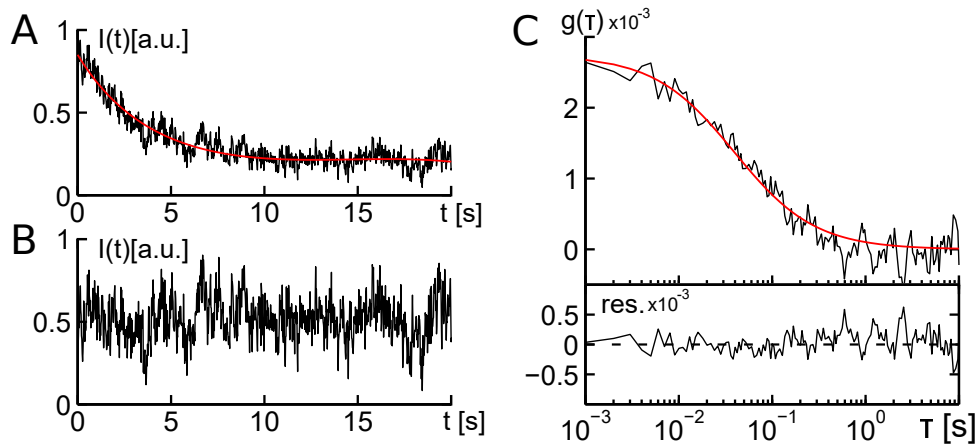
Diffusionsmessungen an diesem Protein mittels *scanning*-FCS lieferten in früheren Studien Werte für  $D_{\text{Membran}} = (1,1 \pm 0,3) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Zyto}} = (8,1 \pm 2,0) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  [37], während aus FRAP-Experimenten Werte der Membrandiffusion von  $D_{\text{Membran}} = (1,7 \pm 0,2) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit typischen Residenzzeiten von  $\tau = (8,3 \pm 1,1)\text{s}$  auf der Membran gemessen wurden [164]. Hiermit befindet sich das Protein in einem für SPIM-FCS messtechnisch zugänglichem Bereich der Diffusion.

### Versuchsdurchführung, Datenevaluation und Ergebnisse der Diffusionsmessungen

Die Messungen werden in frühen Embryonen der bereits zuvor in dieser Arbeit verwendeten Wurmlinie **OD58** durchgeführt (siehe Abb. 7.1 A). Hierfür werden Embryonen zu einem Zeitpunkt vor der ersten Zellteilung nach der in Unterkap. 5.1 beschriebenen Methodik präpariert, in der Mitte des Lichtblatts positioniert und eine konsekutive Bildaufnahme gestartet. Die Aufnahmeparameter der Messungen sind wie folgt:

- Laserleistung (491nm): 50mW
- AOTF (491nm): 1 – 10V (Leistung an hinterer Objektiv-Apertur: 0,8 – 26,0mW )
- 20.000 Einzelaufnahmen + 2.000 Hintergrundaufnahmen
- Kamerabelichtungszeit: 152 – 1004 $\mu\text{s}$
- Binning (on-chip):  $2 \times 2$
- ROI:  $(400 \times 28) - (400 \times 208)$  Pixel
- Lichtblattdicke: 1,2 $\mu\text{m}$

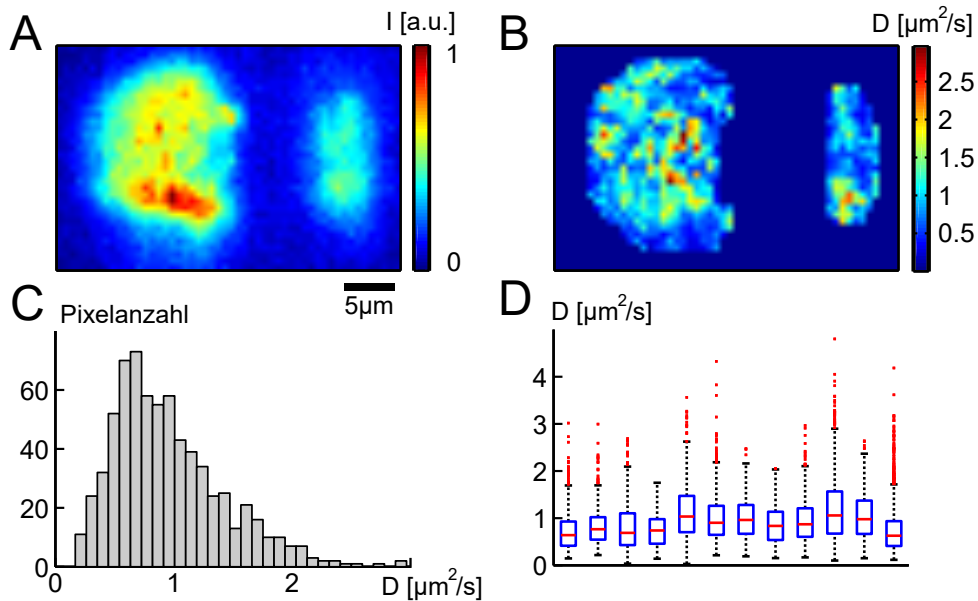
Für Messungen der Membrandiffusion wird die Aufnahme in der dem Detektionsobjektiv zugewandten Ebene gelegt, um Aberrationen zu minimieren (siehe Abb. 7.1).



**Abb. 7.2:** Beispielkurven für die Intensitätskurve, Bleichkorrektur und Autokorrelationsfunktion einer SPIM-FCS-Messung in der Membran

(A) Das unkorrigierte Intensitätssignal eines Pixels einer Messung in der Membran des Embryos zeigt einen deutlichen Abfall aufgrund von Bleichprozessen in der Probe hin zu einem asymptotischem Verlauf zum Ende der Messung. Der Abfall wird über einen Fit (rot) nach Gl. 6.1 erfasst. (B) Die nach Gl. 6.2 korrigierte Intensitätskurve zeigt den erwarteten Verlauf von Fluktuationen um einen konstanten Mittelwert. (C) Der Abfall der aus der korrigierten Intensitätskurve resultierende Autokorrelationsfunktion wird über einen entsprechenden Fit (rot) eines zweidimensionalen Diffusionsverhaltens erfasst und der Diffusionskoeffizient kann als offener Fit-Parameter ermittelt werden. ( $a = 650\text{nm}$ ,  $\tau_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$ ) *Abbildung nach [103]*

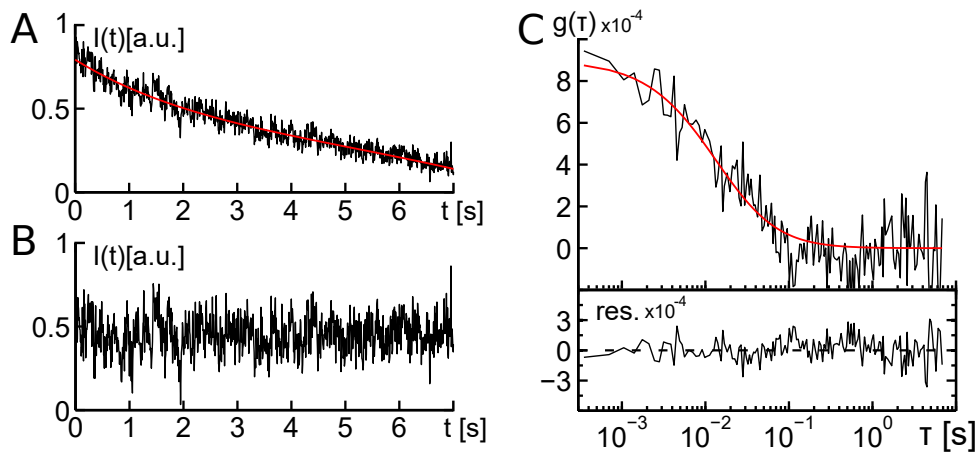
Um eine mögliche Membranbewegung innerhalb des Lichtblatts während der Aufnahmedauer aufgrund der Entwicklung und Umstrukturierung im Embryo zu vermeiden, werden die Membranmessungen in zeitlich stabilen Sequenzen der Embryonalentwicklung durchgeführt. Hierfür werden Embryonen im Einzellzustand vor der ersten Zellteilung und im Zweizellzustand verwendet. Eine Begrenzung der Messdauer auf maximal 20s erzielte hierbei größtenteils zufriedenstellende Ergebnisse. Diffusionsmessungen im Zytoplasma sind bezüglich der Wahl des Messzeitpunkts unkritischer, wobei darauf geachtet wird, nur während der Interphase des Zellzyklus zu messen. Zur Steigerung des Signals durch eine leicht erhöhte Fluorophorexpression wird die Temperatur in der Probenkammer für die Messung auf 25°C erhöht. Die vergleichsweise hohe Anregungsleistung des Lasers ist in der für die FCS-Messungen notwendigen hohen Aufnahme-rate begründet. Diese führt zu Integrationszeiten des Kamerasensor, welche um einen Faktor 50 – 500 kleiner sind im Vergleich zu üblichen Belichtungszeiten bei Langzeitaufnahmen (siehe Unterkap. 5.1). Um dennoch ein für die Auswertung ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen, wird der Abfall der detektierten Intensität zum einen durch ein  $2 \times 2$ -*on-chip*-Binning als auch durch eine erhöhte Anregungsleistung kompensiert, was wiederum zu Bleichprozessen und der Notwendigkeit einer Bleichkorrektur nach Gl. 6.2 führt. Ein Beispiel der Intensitätskurve einer Membranmessung ist mit dem zugehörigem Fit der Bleichkurve in Abb. 7.2 A zu sehen. Die korrigierte Intensitätskurve ist in Abb. 7.2 B gezeigt und stellt den entsprechenden Verlauf einer um einen konstanten Mittelwert fluktuierenden Größe dar.



**Abb. 7.3: Beispiel einer SPIM-FCS-Messung in der Membran und Statistik über mehrere Messungen**

(A) Das normierte Intensitätsbild einer Messung in der Membran eines Embryos im Zweizellzustand zeigt eine heterogene Proteinansammlung auf der Membran. Anhand der Intensitätswerte lassen sich Bereiche der Aufnahme außerhalb der Membran entsprechend maskieren. (B) Die durch den Fit erhaltenen Werte des Diffusionskoeffizienten lassen sich als zweidimensionale Abbildung wiedergeben. In dieser Darstellung ist bereits eine Heterogenität des Diffusionsverhaltens zu erkennen. (C) Die Statistik aller ausgewerteten Pixel bezüglich des erhaltenen Diffusionskoeffizienten zeigt eine breite Verteilung um einen Mittelwert von  $(0,95 \pm 0,46) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . ( $a = 650\text{nm}$ ,  $\tau_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$ ) (D) Die Ergebnisse mehrerer Messungen an unterschiedlichen Embryonen sind jeweils als Boxplot dargestellt. Die Medianwerte der einzelnen Werte schwanken zwischen  $D_{\text{Median}} = 0,63\text{--}1,04 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . ( $a = 650\text{nm}$ ,  $\tau_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$ ) *Abbildung nach [103]*

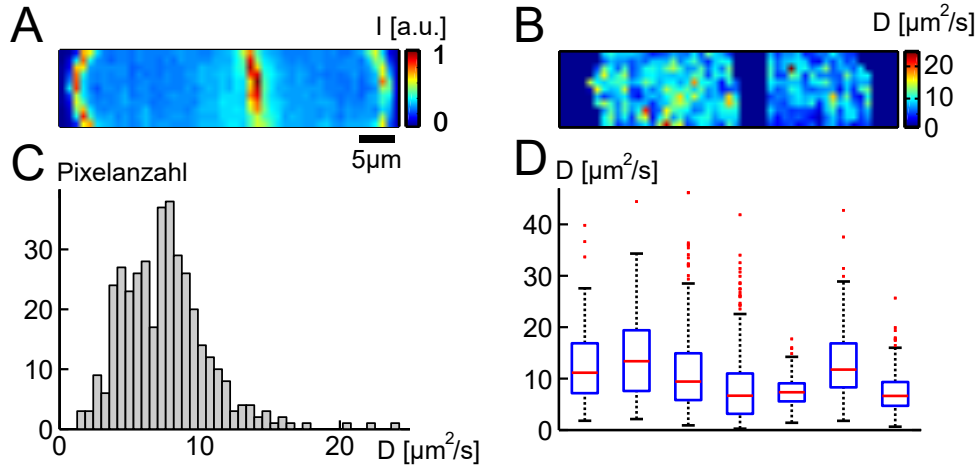
Die aus dem so korrigierten Pixelintensitätsverlauf resultierende Autokorrelationskurve ist in Abb. 7.2 C mit dem zugehörigem Fit basierend auf einer zweidimensionalen Diffusion auf der Membran nach Gl. 3.35 zu sehen. Die Zeitaufösung des Abfalls der Autokorrelationsfunktion ermöglicht bei einer Pixelgröße von  $a = 650\text{nm}$  (effektives Binning von  $4 \times 4$ ) die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zur weiteren Evaluation. Das Ergebnis einer SPIM-FCS-Messungen in der oberen Membran eines zweizelligen Embryos ist in Abb. 7.3 zu sehen. Über das gemittelte Intensitätsbild der Langzeitaufnahme (Abb. 7.3 A) können die Pixelbereiche außerhalb der Membran anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität als Hintergrund maskiert werden, um in späteren Schritten der Auswertung nicht weiter berücksichtigt zu werden. Die Fluoreszenzintensität selbst zeigt auf der Membran unterschiedliche Bereiche höherer Fluorophorkonzentrationen. In der aus den Fit-Ergebnissen entstandenen Diffusionskarte (Abb. 7.3 B) ist eine deutliche Streuung der erhaltenen Diffusionskoeffizienten mit Regionen höherer und niedrigerer Diffusion zu erkennen. Dies spiegelt, zusammen mit der Breite der Verteilung aus der Statistik über alle evaluierten Pixel in der Messung (Abb. 7.3 C), zum einen nicht zu vermeidende Ungenauigkeiten der Messung bzw. des Fit-Prozesses wieder, kann aber auch Aufschluss über ein gewisses Maß einer Heterogenität im Diffusionsverhalten auf der Membran geben. Die hier exemplarisch gezeigte Verteilung besitzt einen Mittelwert von  $(0,95 \pm 0,46) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  (Binning  $4 \times 4$ ) mit der Standardabweichung aller Pixel als Fehler und liegt somit im erwarteten Bereich des Diffusionskoeffizienten aus früheren FCS-Studien [37]. 12 unterschiedliche Membranmessungen an Embryonen ergaben vergleichbare Verteilungen mit Medianwerten im Bereich von  $D_{\text{Median}} = 0,63\text{--}1,04 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  ( $a = 650\text{nm}$ , Abb. 7.3 D).



**Abb. 7.4: Beispielkurven für die Intensitätskurve, Bleichkorrektur und Autokorrelationsfunktion einer SPIM-FCS-Messung im Zytoplasma**

(A) Das unkorrigierte Intensitätssignal eines Pixels einer Messung im Zytoplasma des Embryos zeigt einen Abfall aufgrund von Bleichprozessen in der Probe. Im Vergleich zu Membranmessungen (siehe Abb. 7.2) erfolgt der Abfall langsamer, was in dem höheren Austausch von Proteinen aus dem restlichen Zytoplasma begründet sein kann. Der Abfall wird über einen Fit (rot) nach Gl. 6.1 erfasst. (B) Die korrigierte Intensitätskurve zeigt diffusionsbasierte Fluktuationen um einen konstanten Mittelwert. (C) Der Abfall der Autokorrelationsfunktion wird im Rahmen eines auf dreidimensionaler Diffusion basierten Fits (rot) erfasst. Die Kurve zeigt einen Abfall auf einer kürzeren Zeitskala aufgrund der schnelleren zytoplasmischen Diffusion und ein höheres Rauschen im Vergleich zu Membranmessungen. Dies ist in der geringeren Intensität der aufgenommenen Intensitätskurve aufgrund der niedrigeren Proteinkonzentration und der notwendigerweise höheren Aufnahmezeit der Messungen begründet. ( $a = 975\text{nm}$ ,  $\tau_{\text{min}} = 351\mu\text{s}$ )  
Abbildung nach [103]

In allen Verteilungen fallen einzelne Ausreißer zu höheren Diffusionskoeffizienten auf, die auf einen eventuellen Beitrag schnellerer zytoplasmischer Diffusion in der ACF hindeuten. Der Intensitätsverlauf mit verwendeter Bleichkorrektur sowie der korrigierte Intensitätsverlauf eines Pixels einer Messung im Zytoplasma sind in Abb. 7.4 A,B gezeigt. Der bleichinduzierte Intensitätsabfall geschieht hierbei langsamer als auf der Membran, was mit dem höheren Grad an Teilchenaustausch im Zytoplasma erklärt werden kann. Die erhaltene Autokorrelationskurve in Abb. 7.4 C zeigt neben einem Abfall bei einer kleineren charakteristischen Zeitskala, wie es für die schnellere zytoplasmische Diffusion zu erwarten ist, auch größere Schwankungen der Kurve aufgrund des niedrigeren Signal-Rausch-Verhältnisses bei Messungen im Zytoplasma. Dies ist zum einen in dem geringeren Signal einer reduzierten zytoplasmischen Konzentration des Proteins begründet als auch in der nun notwendigerweise höheren verwendeten Zeitauflösung (hier  $\tau_{\min} = 351\mu\text{s}$ ) und der damit verbundenen Signalerniedrigung, um den schnelleren Abfall der Autokorrelationsfunktion noch verlässlich fitten zu können. Der Diffusionskoeffizient kann trotz der niedrigeren Datenqualität im Vergleich zu Membranmessungen durch die höhere Zeitauflösung und unter Verwendung eines erhöhten effektiven Binnings von  $6 \times 6$  ( $a = 975\text{nm}$ ) mit einem Fit basierend auf dreidimensionaler Diffusion nach Gl. 3.29 bestimmt werden. Das exemplarische Ergebnis einer Messung im Zytoplasma ist in Abb. 7.5 gezeigt. Erneut erfolgt anhand des Intensitätsbildes eine Maskierung von Bereichen, die entweder Hintergrund oder Membransegmente beinhalten. Aufgrund der hohen nötigen Aufnahmeraten  $> 1000\text{fps}$  wird nur ein schmalerer Bereich des Sensors ausgelesen, was dazu führt, dass Teile des Embryos nicht mehr in der aufgenommenen ROI liegen. Die erhaltene Diffusionskarte zeigt erneut eine räumliche Verteilung unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten, welche ihren Ursprung in zytoplasmischer Heterogenität z.B. aufgrund der Präsenz von Zellorganellen oder Makromolekülen haben kann, zu einem gewissen Teil aber auch der eingeschränkten Datenqualität geschuldet ist.



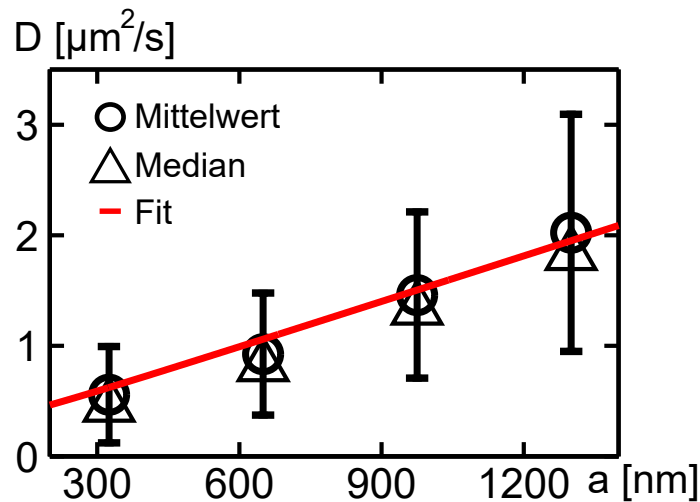
**Abb. 7.5: Beispiel einer SPIM-FCS-Messung im Zytoplasma und Statistik über mehrere Messungen**

(A) Das normierte Intensitätsbild einer Messung im Zytoplasma eines Embryos im Zweizellzustand zeigt eine geringe Heterogenität des zytoplasmischen Proteinanteils. Klar erkennbare Membranbereiche werden vor der Auswertung maskiert. (B) Die Diffusionskarte im Zytoplasma zeigt ein heterogenes Diffusionsverhalten. (C) Die Statistik über alle Pixel zeigt eine breite Verteilung der gemessenen Diffusionskoeffizienten um einen Mittelwert von  $(7,48 \pm 2,78) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  ( $a = 975\text{nm}$ ,  $\tau_{\min} = 351\mu\text{s}$ ). (D) Die Ergebnisse mehrerer Messungen an unterschiedlichen Embryonen sind als Boxplot dargestellt. Die Medianwerte der einzelnen Werte schwanken zwischen  $D_{\text{Median}} = 6,63\text{--}13,38 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . ( $a = 975\text{nm}$  mit  $\tau_{\min} = 154\text{--}1004\mu\text{s}$ ) *Abbildung nach [103]*

Die Statistik aller ermittelten Diffusionskoeffizienten in der Aufnahme zeigt eine entsprechende Breite der Verteilung um einen Mittelwert von  $(7,48 \pm 2,78) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit der Standardabweichung als Fehler. Die Diffusion von PLC1 $\delta$ 1 ist somit im Zytoplasma ungefähr eine Größenordnung schneller als auf der Membran. Die gemessenen Werte decken sich wiederum im Rahmen der Fehler mit den Ergebnissen früherer FCS-Studien [37]. Die gemessenen Verteilungen aus insgesamt 7 Messungen an frühen Embryonen zeigen vergleichbare Verteilungen des Diffusionskoeffizienten mit Medianwerte im Bereich von  $D_{\text{Median}} = 6,63\text{--}13,38 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  ( $a = 975\text{nm}$ ).

#### Bestimmung der Residenzzeit auf der Membran über Pixel-Binning

Betrachtet man die erhaltenen Diffusionskoeffizienten aus den Membranmessungen an PLC1 $\delta$ 1 zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Verteilungen der erhaltenen Diffusionskoeffizienten für anwachsende Pixelgrößen im Bereich von  $a = 325\text{--}1300\text{nm}$  (siehe Abb. 7.6). Dieses Phänomen zeigt sich nicht für Messungen im Zytoplasma. Hier beträgt der Mittelwert mit Standardabweichung aus allen Messungen im Zytoplasma  $D_{\text{Zyto}} = (10,22 \pm 6,66) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  für  $a = 975\text{nm}$  und  $D_{\text{Zyto}} = (10,94 \pm 6,30) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  für  $a = 1300\text{nm}$ . Messungen für kleinere Pixelgrößen sind aufgrund der Datenqualität hier nicht mehr verlässlich auswertbar. Der weitgehend konstante Wert der zytoplasmischen Diffusion lässt einen systematischen Fehler der Auswertung, z.B. aufgrund einer Unterschätzung der lateralen Auflösung (siehe Unterkap. 6.1) als unwahrscheinlich erscheinen.



**Abb. 7.6: Anstieg des effektiv gemessenen Diffusionskoeffizienten für ansteigende Pixelgrößen**

Gezeigt sind die Mittel- und Medianwerte (Kreise und Dreiecke) aus den Verteilung aller gemessenen Pixel für unterschiedliche Pixelgrößen. Die Fehler entsprechen den Standardabweichungen der Verteilungen. Die Verteilungen der Messwerte steigen für größere Pixelabmessungen an, was im Rahmen von Gl. 7.3 aufgrund des Einflusses der begrenzten Residenzzeit  $T$  rationalisiert werden kann. Ein Fit nach Gl. 7.3 (rot) mit realistischen Werten der Diffusion auf Membran und im Zytoplasma erfasst den Anstieg der Verteilungen und bestätigt mit  $T = 2,8\text{s}$  eine Residenzzeit des peripheren Membranproteins PLC1 $\delta$ 1 im Sekundenbereich. *Abbildung nach [103]*

Der scheinbare Anstieg des gemessenen Diffusionskoeffizienten kann anders erklärt werden. Ein Nebeneffekt des erhöhten Binnings ist die Verschiebung der Diffusionszeit im nun vergrößerten Observationsbereich zu längeren Zeitskalen. Als peripheres Membranprotein verbleibt PLC1 $\delta$ 1 jedoch nur für einen Zeitraum im Bereich von wenigen Sekunden auf der Membran [163?] um anschließend wieder in das Zytoplasma zurückzufallen. Die Entbindung von der Membran und



die gemessenen Beiträge der erhöhten zytoplasmischen Diffusion führen so zu einer relativen Erniedrigung des Werts der effektiv gemessenen Diffusionszeit und somit zu einer Erhöhung des daraus abgeleiteten Diffusionskoeffizienten. Dieser Effekt wurde auch in FRAP-Messungen an identischen Proben in früheren Studien berichtet, wo eine Vergrößerung der Bleichregion bei einer Annahme einer rein diffusiven Erholung des Messsignals zu einem anwachsenden gemessenen Diffusionskoeffizienten führte [164].

Während der Messdauer lässt sich der Rückfall der Proteine von der Membran ins Zytoplasma im Observationsvolumen im Rahmen eines Poisson-Prozesses mit der Wahrscheinlichkeit  $p(t) = 1 - e^{-k \cdot t}$  mit einer Rate  $k$  beschreiben. Die gemittelte Diffusionszeit  $\tau_{\text{Diff}}$  durch die Observationsfläche  $R^2$  ist somit gegeben über

$$\tau_{\text{Diff}} = \frac{R^2}{4 \{ (1 - p(\tau)) D_{\text{Membran}} + p(\tau) D_{\text{Zyto}} \}} \quad (7.1)$$

mit den tatsächlichen Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{Membran}}$  und  $D_{\text{Zyto}}$ . Mit typischen Diffusionszeiten  $\tau_{\text{Diff}}$  im Bereich  $< 100\text{ms}$  und erwarteten Residenzzeiten auf der Membran im Sekundenbereich ergibt sich die Näherung  $p(\tau_{\text{Diff}} \ll \frac{1}{k}) \approx k \cdot \tau_{\text{Diff}}$ . Hieraus ergibt sich eine Diffusionszeit von

$$\tau_{\text{Diff}} = \frac{\sqrt{1 - R^2 \frac{D_{\text{Zyto}} - D_{\text{Membran}}}{D_{\text{Membran}}^2 \cdot T}} - 1}{2 \frac{D_{\text{Zyto}} - D_{\text{Membran}}}{D_{\text{Membran}} \cdot T}} = \frac{\sqrt{1 - R^2 \frac{\xi}{D_{\text{Membran}}}} - 1}{2\xi} \quad (7.2)$$

mit  $\xi = (D_{\text{Zyto}} - D_{\text{Membran}})/(D_{\text{Membran}} \cdot T)$  und der Residenzzeit  $T$  des Proteins auf der Membran. Der effektiv gemessene Diffusionskoeffizient  $D_{\text{eff}}$  wird so abhängig von der Größe der Observationsfläche  $R^2$  mit

$$D_{\text{eff}}(R^2) = \frac{R^2}{4\tau_{\text{Diff}}} = \frac{\xi R^2}{2 \left( \sqrt{1 + R^2 \frac{\xi}{D_{\text{Membran}}}} - 1 \right)} \quad (7.3)$$

beschrieben und wächst bei größeren Werten für  $R^2$  aufgrund der begrenzten Residenzzeit der Proteine auf der Membran. Eine in Abb. 7.6 gezeigte Abschätzung basierend auf Gl. 7.3 und unter Verwendung realistischer Werte der Diffusionskoeffizienten und Residenzzeiten ( $D_{\text{Zyto}} = 8 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ,  $D_{\text{Membran}} = 0,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $T = 2,8\text{s}$ ) gibt den Trend der experimentell ermittelten Werte des gemessenen Diffusionskoeffizienten auf der Membran für eine anwachsende Pixelgröße entsprechend wieder und bestätigt die zuvor berichteten Zeitskalen der Proteinresidenzzeit auf der Membran im Sekundenbereich [103, 163? ]. Die Abhängigkeit der Größe der Observationsfläche  $R^2$  von der Pixelgröße  $a$  nach Gl. 3.33 wurde hierbei für den gemessenen Bereich zu  $R \approx a/0,6$  angenähert. Trotz einiger Näherungen, unter anderem der fehlende Berücksichtigen von Ereignissen, bei denen zytoplasmische Proteine während der Messung an die Membran anhaften, ermöglicht dieses relativ simple Modell bereits die Quantifizierung von (Ent-)Bindungsereignissen an Membranen anhand von Diffusionsquantifizierungen auf unterschiedlichen Längenskalen. Die Überprüfung eines eventuellen Einflusses anomaler Diffusion bzw. die Untersuchung des Verhaltens der Diffusionszeiten auf unterschiedlichen Längenskalen nach dem *FCS-Diffusion-Law* [149, 150] bezüglich einer Kompartimentalisierung bzw. Struktur auf der Membran wird an dieser Stelle aufgrund des vermeintlich dominanten Charakters der begrenzten Residenzzeit der Proteine auf der Membran unterlassen, auch wenn ein möglicher Einfluss dieser Faktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

### **Zusammenfassung**

Die hier gezeigten Messungen der Proteindiffusion von PLC1 $\delta$ 1 stellen den ersten berichteten Einsatz der SPIM-FCS-Technik zur Quantifizierung der Proteindiffusion und Bindung in frühen Embryonen des *C. elegans* dar. Sowohl die langsame Diffusion auf der Membran als auch die schnelle zytoplasmische Diffusion konnten hierbei gemessen werden. Die so erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Berichten früherer Studien überein. Neben der Möglichkeit so auch potentielle Heterogenitäten in der zweidimensionalen Ebene der Probe untersuchen zu können wurde des weiteren gezeigt, wie eine längenskalenabhängige Untersuchung des Diffusionsverhaltens auf der Membran zur Abschätzung der Residenzzeit eines peripheren Membranproteins genutzt werden kann. Ausgehend von den Ergebnissen dieses Kapitels in Form eines ersten erfolgreichen Einsatzes der SPIM-FCS-Technik in *C. elegans*-Embryonen sollen nun im nachfolgenden Abschnitt Messungen an einem Protein mit einem anisotropen Diffusionsverhalten unternommen werden.

## 7.2. Verfolgung der Diffusionsgradientenentwicklung von PIE-1

*Dieses Projekt wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den Verfasser begonnen und nachfolgend im Rahmen einer Masterarbeit von Dirk Hofmann [141] am Lehrstuhl unter Betreuung durch den Verfasser dieser Arbeit weitergeführt. Projektkonzeptionierung, erste Messungen sowie die Erstellung der frühen Fassungen der Auswerteskripte und der Datenevaluation wurden vom Verfasser dieser Arbeit durchgeführt. Weitere Messungen sowie die Weiterentwicklung von Auswerteskripten, unterstützende konfokale FCS-Messungen und die Auswertung der späteren Gesamtdaten erfolgten unter Betreuung durch Herrn Hofmann.*

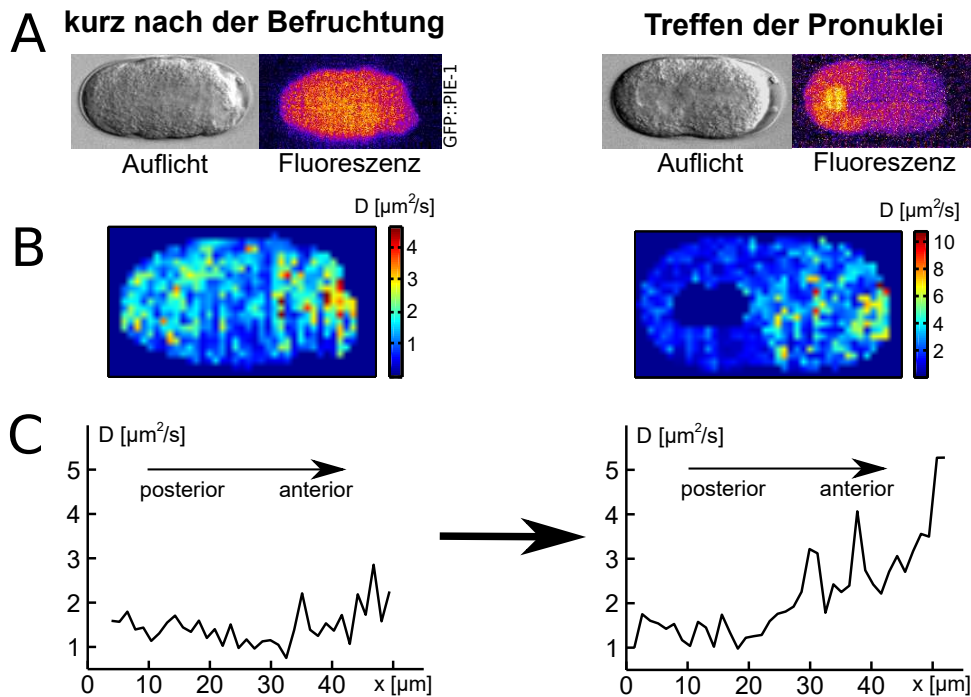
### Zielsetzung und Motivation

Nach den erfolgreichen Kalibrationsmessungen, sowie Messungen an zytoplasmischer Diffusion und der Diffusion auf Membranen im lebenden frühen Embryo [103], soll in einem nächsten Schritt ein entstehender Proteindiffusionsgradient im frühen Embryo räumlich und zeitlich untersucht werden. Die Möglichkeit Diffusion in einer kompletten Ebene des Embryos zur gleichen Zeit zu messen liefert hierbei unter der Annahme eines annähernd rotationssymmetrischen Gradienten einen Einblick in das Diffusionsverhalten im gesamten Embryo zum Zeitpunkt der Messung. Ein interessanter Untersuchungsgegenstand im frühen *C. elegans* ist hierbei die Entstehung des Konzentrations- und Diffusionsgradienten des Proteins PIE-1 (siehe Unterkap. 2.2.2).

Das Protein PIE-1 spielt im frühen Embryo die Rolle einer Keimbahndeterminante, indem es sowohl als Transkriptionsrepressor als auch als Expressionspromoter fungiert [165, 166]. PIE-1 wird hierbei zwischen dem Zeitpunkt der Befruchtung und der ersten Zellteilung von einer zunächst räumlich homogenen Verteilung ausgehend am posterioren Ende, dem späterem Entstehungsort der  $P_1$ -Zelle, angereichert. Die verbleibende Proteinkonzentration im anterioren Ende wird nach der ersten Zellteilung in der entstandenen *AB*-Zelle abgebaut [167, 168]. Der zugrundeliegende Prozess der räumlichen Proteinumverteilung von PIE-1 vor der ersten Zellteilung ist nach wie vor diskutiert. Daniels et al schlagen hierfür ein heterogenes Reaktions-/Diffusionsmodell vor, innerhalb dessen eine Erniedrigung des Diffusionskoeffizient von PIE-1 im posterioren Ende die dortige Anreicherung unterstützt [36]. Der entstehende Konzentrationsgradient steht in Abhängigkeit zum inversen Gradienten der Proteine MEX-5/6 (siehe Unterkap. 2.2.2), so dass ein Gen-*Knockdown* der MEX-5/6 Expression zu einem Ausbleiben der posterioren Anreicherung von PIE-1 führt [36, 169]. Da die PIE-1-Gesamtkonzentration im Embryo für die MEX-5/6-Mutanten zum Wildtypen vergleichbar bleibt, wird ein Modell basierend auf einer Proteindegradation auf anteriorer Seite durch die dort höhere MEX5/6-Konzentration als zugrundeliegender Prozess der Konzentrationsgradientenentstehung ausgeschlossen [36]. Ergebnisse von Bleichexperimenten hinsichtlich einer möglichen Immobilisierung des Proteins im posterioren Bereich des Zytoplasmas, sowie der Möglichkeit einer Diffusionsbarriere entlang der anterior-posterior Grenze im Embryo schließen auch diese beiden Möglichkeiten aus [36]. Frühere Studien belegen neben dem Konzentrationsgradienten von PIE-1 einen zusätzlichen Diffusionsgradienten mit einer niedrigeren Diffusion im posteriorem Bereich und einer höheren Diffusion im anteriorem Bereich [36, 169]. FCS-Messungen im anterioren und posterioren Ende eines befruchteten Wurmes zum Zeitpunkt des Zusammenbruchs der Nukleushülle (*nuclear envelope breakdown*, **NEBD**) ergeben Werte des Diffusionskoeffizienten von PIE-1 von  $D_{\text{Anterior}} = (8,03 \pm 0,34) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Posterior}} = (0,61 \pm 0,12) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit Anomalieparametern der Diffusion von  $\alpha_{\text{Anterior}} = 0,65 \pm 0,01$  und  $\alpha_{\text{Posterior}} = 0,35 \pm 0,02$  [169]. Eine Kombination aus FRAP- und FCS-Messungen im Rahmen eines zwei- bis dreikomponentigen Fit-Modells einfacher Diffusion ergab Werte von  $D_{\text{Anterior,schnell}} = (8,7 \pm 0,7) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Anterior,langsam}} = (0,6 \pm 0,2) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einer schnellen Fraktion von  $\rho_{\text{Anterior,schnell}} = 0,8$ , sowie  $D_{\text{Posterior,schnell}} = (14,2 \pm 7,8) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ,  $D_{\text{Posterior,langsam}} = (0,6 \pm 0,3) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Posterior,sehr langsam}} = (0,006 \pm 0,002) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einer schnellen Fraktion

von  $\rho_{\text{Posterior,schnell}} = 0,3$  und einer langsamen Fraktion von  $\rho_{\text{Posterior,langsam}} = 0,4$  [36]. Beiden Studien gemeinsam ist die Beobachtung höherer Diffusionskoeffizienten bzw. größerer Anteile einer schnellen Fraktion im anterioren Teil des Embryos. Abweichend von Daniels et al, die eine Erniedrigung der Diffusion von PIE-1 auf posteriorer Seite vorschlagen [36], erklärt Wu et al den entstehenden Diffusionsgradienten mit einer durch MEX-5/6 induzierten Erhöhung der PIE-1-Diffusion auf anteriorer Seite, was durch RNAi Experimente gestützt wird, in denen ein *Knockdown* von MEX-5/6 zu einem nahezu gleichverteilten Diffusionskoeffizienten von PIE-1 von  $D_{\text{Anterior,Knockdown}} = (0,82 \pm 0,12) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und  $D_{\text{Posterior,Knockdown}} = (0,63 \pm 0,10) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  führt [169].

Um die oben genannten Ergebnisse früherer Studien zu überprüfen und den zeitlichen Verlauf des Diffusionsgradienten in einer räumlich ausgedehnten Ebene des Wurmes zu quantifizieren, sollen SPIM-FCS-Messungen an frühen Embryonen der Linie JH1327 (PIE-1::GFP) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (kurz nach der Befruchtung, zum Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei



**Abb. 7.7: Entstehender Diffusionsgradient von PIE-1**

(A) Zum Zeitpunkt kurz nach der Befruchtung (sichtbar an der gewellten Oberfläche des Embryos in der Auflichtaufnahme) zeigt das Intensitätsbild einer Fluoreszenzaufnahme eine homogene Verteilung des fluoreszenzmarkierten Proteins im Embryo. Zum späteren Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei (zu erkennen in der Auflichtaufnahme im linken Bereich des Embryos) hat sich bereits ein Konzentrationsgradient der Proteinverteilung ausgebildet. Ebenso ist die erhöhte Konzentration von PIE-1 am männlichen Pronukleus zu erkennen [170]. (B) Diffusionskarten aus SPIM-FCS-Messungen ( $a = 1300\text{nm}$  mit  $t_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$ ) basierend auf einer einkomponentigen freien Diffusion zeigen eine weitgehend heterogene Verteilung im frühen Embryo mit vereinzelt erhöhten Werten auf der anterioren Seite. Zum späteren Zeitpunkt ist eine deutliche Erhöhung des Diffusionskoeffizienten auf der anterioren Seite zu erkennen. (C) Der für jede Spalte gemittelte Wert des Diffusionskoeffizienten entlang der  $x$ - bzw. anterior-posterior-Achse zeigt im frühen Embryo einen weitgehend konstanten Verlauf, während nach der Ausbildung des Konzentrationsgradienten von PIE-1 ein klarer Anstieg zu höheren Diffusionskoeffizienten sichtbar wird. Auf posteriorer Seite bleiben die Werte weitgehend unverändert.

und im frischem Einzellzustand kurz vor der ersten Zellteilung) durchgeführt und die räumlich und zeitliche Entwicklung der Proteindiffusion verglichen werden.

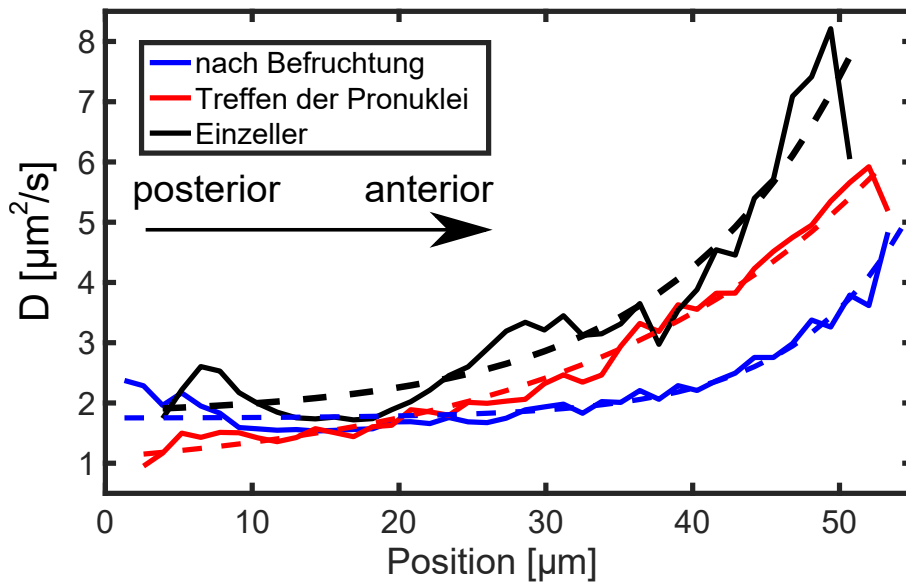
### **Versuchsdurchführung, Datenevaluation und Ergebnisse einer einkomponentigen Auswertung**

Für SPIM-FCS-Messungen werden die Embryonen wie in Unterkap. 5.1 beschrieben präpariert, in der Mitte des Lichtblatts positioniert und die Messung zum gewünschten Zeitpunkt gestartet. Die Wurmlinie wird hierbei aufgrund der Tendenz ihre stabile Transfektion mit der Zeit zu verlieren bei 24°C gehalten und nur solche Würmer für neue Platten und Messungen ausgewählt, die deutlich den zur Transfektion zugehörigen *Roller*-Phänotypen zeigten. Die Aufnahmeparameter sind wie folgt:

- Laserleistung (491nm): 50mW
- AOTF (491nm): 4,5 – 10V (Leistung an hinterer Objektiv-Apertur: 12,7 – 26,0mW )
- 20.000 Einzelaufnahmen + 2.000 Hintergrundaufnahmen
- Kamerabelichtungszeit: 1004µs
- Binning (on-chip):  $2 \times 2$
- Temperatur in Probenkammer: 24°C
- ROI:  $(400 \times 208)$  Pixel
- Lichtblattdicke: 1,2µm

Die Aufnahmeebene wird mittig im Embryo gewählt, um den erwarteten Diffusionsgradienten entlang der mittleren Ebene aufnehmen zu können. Vergleichbar zu den Messungen an PLC1δ1 muss für eine ausreichende Datenqualität der Autokorrelationskurven die Anregungsintensität während der Messung weit oberhalb der für Bildaufnahmen üblichen Leistungswerte gewählt werden, was eine Bleichkorrektur der Intensitätsverläufe nötig macht. Dies ermöglicht zwei bis drei verwertbare Messungen pro Embryo, deren Zustand in einer anschließenden Auflichtaufnahme bis zum Drei-/Vierzellzustand verfolgt wird. Um eine ausreichende Datenqualität für die Fit-Prozedur zu erreichen wird zudem ein Software-Binning von  $(2 \times 2)$  -  $(4 \times 4)$  verwendet. Der Rest der Datenauswertung ist vergleichbar zu den weiter oben beschriebenen Messungen an PLC1δ1. Zwei Beispiele einer Auflicht- und Fluoreszenzaufnahme zu Zeitpunkten vor Entstehung des Konzentrationsgradienten und danach sind in Abb. 7.7 A gezeigt. Während zum Zeitpunkt kurz nach der Befruchtung eine weitgehend homogene Intensitätsverteilung entlang des Embryos auf eine ebenso homogene Verteilung der Proteinkonzentration schließen lässt zeigt derselbe Embryo zum Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei bereits eine deutlich erhöhte Konzentration auf der posterioren Seite. Diffusionskarten in Abb. 7.7 B stellen die aus der SPIM-FCS-Messung und einem einkomponentigen Fit normaler Diffusion extrahierten Diffusionskoeffizienten dar. Diese zeigen neben einer gewissen Heterogenität über den gesamten Embryo hinweg auch einen leicht erhöhten Diffusionskoeffizient auf anteriorer Seite bereits zum ersten Zeitpunkt. Zum späteren Zeitpunkt lässt sich ein deutlicher Anstieg der gemessenen Diffusionskoeffizienten auf anteriorer Seite feststellen. Graphen des gemittelten Diffusionskoeffizienten für die jeweilige  $x$ -Position entlang der AP-Achse in Abb. 7.7 C zeigen den zunächst relativ gleichmäßigen Verlauf von  $D$  in einem Bereich von  $0,75 - 2,85 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einem Mittelwert von  $(1,46 \pm 0,42) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Der Bereich der Diffusionskoeffizienten erhöht sich unter der Ausbildung des Konzentrationsgradienten auf Werte bis zu  $5,27 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  auf anteriorer Seite. Betrachtet man

nur die posteriore Seite (hier angenommen als die ersten 50% entlang der anterior-posterior-Achse) so wird dort ein Mittelwert von  $D_{\text{Posterior}} = (1,43 \pm 0,29) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  gemessen, während auf anteriorer Seite ein stark erhöhter Mittelwert von  $D_{\text{Anterior}} = (3,06 \pm 0,96) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  vorhanden ist. Dies zeigt deutlich die bereits in früheren Studien berichtete Erhöhung des Diffusionskoeffizienten in einer auf einkomponentiger Diffusion basierenden Auswertung. Die gemessenen Mittelwerte der beiden Embryohälften sind im posterioren Bereich höher und im anterioren Bereich niedriger als Ergebnisse früherer konfokaler FCS-Messungen [169], was für die hohen Werte des Diffusionskoeffizienten auf der anterioren Seite durch die zu niedrige Zeitauflösung der SPIM-FCS-Messung und das schwache Signal-Rausch-Verhältnisses aufgrund der dort sehr niedrigen Teilchenkonzentration teilweise erklärt werden kann. Des weiteren führt die Verwendung eines Modells anomaler Diffusion in [169] zu entsprechenden Abweichungen der erhaltenen Diffusionskoeffizienten. Der Versuch einer Auswertung im Kontext einer einkomponentigen anomalen Diffusion führte in den SPIM-FCS-Datensätzen aufgrund der Datenqualität allerdings zu keinem schlüssigen Hinweis auf die zuvor berichtete Subdiffusion. Die Ergebnisse gemittelter Messungen aus insgesamt 9 Einzelmessungen kurz nach der Befruchtung, 8 Messungen zum Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei und 10 Messungen im Einzellzustand sind in Abb. 7.8 gezeigt. Teile dieser Messungen, sowie eine Auswertung der gemittelten Datensätze aus den einzelnen Messreihen wurden durch Dirk Hofmann im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt [141]. Diese beinhaltet auch die Korrektur eines  $y$ -Gradienten der Diffusion, die wahrscheinlich durch Aberrationen an der Eihülle des Embryos begründet sind.



**Abb. 7.8: Gradientenentwicklung für mehrere Zeitpunkte**

Gezeigt sind die gemittelten Werte des Diffusionskoeffizienten aus einer auf einer einkomponentigen freien Diffusion basierenden Auswertung für mehrere Messungen an Embryos zu unterschiedlichen Zeitpunkten für  $a = 650\text{nm}$  mit  $t_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$  und einer Binningstufe von 2 Pixelreihen ( $1,3\mu\text{m}$ ) in  $x$ . Während die Werte der Diffusionskoeffizienten auf posteriorer Seite weitgehend ähnlich bleiben, steigen die Werte zum anterioren Ende hin für spätere Zeitpunkte stark an. Der Anstieg lässt sich mit einem exponentiellen Fit (gestrichelte Linien) beschreiben. Die Positionen in  $x$  wurde für spätere Zeitpunkte, in denen die Längsausdehnung des Embryos leicht abnimmt, symmetrisch zu den früheren Zeitpunkten positioniert. *Abbildung nach [141]*

Zeitpunkt	Wertebereich $D$	Mittelwert $D$	$b$
Kurz nach Befruchtung	$1,53 - 4,83 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(2,19 \pm 0,72) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(8,44 \pm 0,79) \mu\text{m}$
Treffen der Pronuklei	$0,95 - 5,92 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(2,70 \pm 1,43) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(18,72 \pm 2,16) \mu\text{m}$
Einzeller	$1,72 - 8,21 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(3,34 \pm 1,71) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	$(12,64 \pm 2,72) \mu\text{m}$

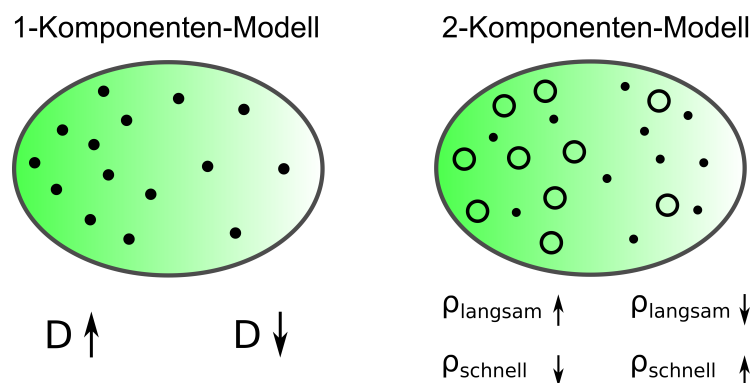
**Tab. 5: Werte der Diffusionskoeffizienten einer einkomponentigen Auswertung**

Gelistet sind die Wertebereiche und Mittelwerte mit Standardabweichung der Diffusionskoeffizienten aus Abb. 7.8, sowie die Werte der charakteristischen Längenskala eines exponentiellen Fits [141].

Zur Berechnung der in Abb. 7.8 gezeigten Diffusionsgradienten werden hierbei die Mittelwerte über alle nicht maskierten Pixel in einem Streifen der Diffusionskarten entlang der  $y$ -Koordinate senkrecht zur AP-Achse sowie für eine endliche Breite in  $x$ , abhängig von einer zusätzlich gewählten Binning-Stufe der Datensätze zur Glättung, berechnet. Der Graph der gemittelten Diffusionskoeffizienten entlang der AP-Achse zeigt einen deutlichen Anstieg des Gradienten zu späteren Zeitpunkten mit ansteigenden Werten des Diffusionskoeffizienten auf anteriorer Seite (siehe auch Tab. 5). Ein exponentieller Fit nach  $D(x) = a \cdot e^{b \cdot x} + c$  (gestrichelte Linien in Abb. 7.8) erfasst den Anstieg des Diffusionskoeffizienten und zeigt einen Abfall der charakteristischen Längenskala  $b$  zwischen dem Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei mit  $b = (18,72 \pm 2,16) \mu\text{m}$  und dem Einzellzustand  $b = (12,64 \pm 2,72) \mu\text{m}$  [141] und damit einen Anstieg der Gradientensteigung. Die charakteristische Längenskala für frisch befruchtete Embryonen ist hierbei mit  $b = (8,44 \pm 0,79) \mu\text{m}$  am kleinsten, jedoch aufgrund des weit ins anteriore Ende verschobenen Beginns des Anstiegs nur bedingt mit den beiden späteren Zeitpunkten vergleichbar.

#### Ergebnisse eines zweikomponentigen Diffusionsmodells

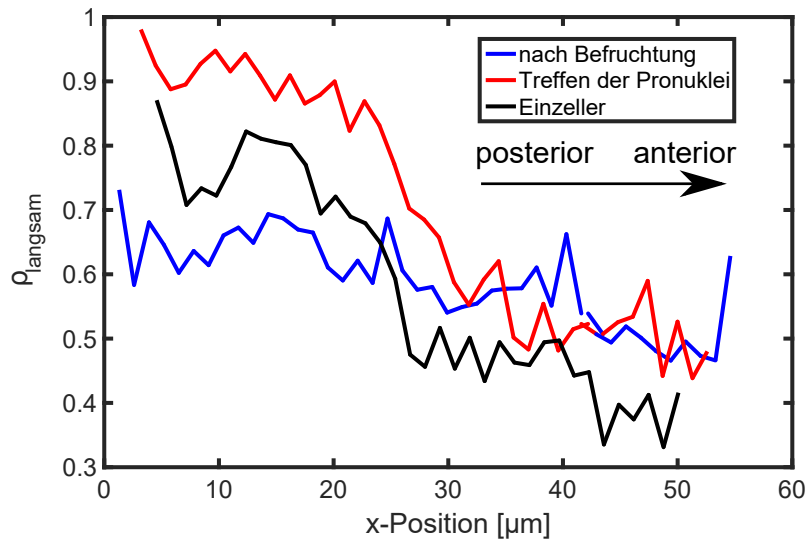
Neben dem Szenario einer einkomponentigen Diffusion, innerhalb derer eine Fraktion an PIE-1 Proteinen in ihrem Diffusionsverhalten lokal beeinflusst wird, verwenden frühere Studien auch unter anderem ein zweikomponentiges Szenario als Grundlage ihrer Datenauswertung [36]. Hierbei liegen zum Zeitpunkt des etablierten Konzentrationsgradienten sowohl eine langsame Komponente von PIE-1 vor, die sich großteils im posterioren Bereich des Embryos befindet, als



**Abb. 7.9: Einkomponentiges und zweikomponentiges Modell des Diffusionsgradienten**

Zur Rationalisierung des entstehenden Diffusionsgradienten von PIE-1 können zwei unterschiedliche Szenarien betrachtet werden. In einer ersten Variante liegt das Protein nur in Form einer einzelnen Komponente vor, welches ihren Diffusionskoeffizienten ortsabhängig entlang der AP-Achse verändert. In einem zweiten Modell liegt das Protein in Form einer schnellen (Punkte in Diagramm) und einer langsamen Komponente (Kreise in Diagramm) vor, deren Anteile entlang der AP-Achse variieren.

auch eine schnellere Fraktion, die sich zum größten Teil auf anteriorer Seite befindet (siehe Abb. 7.9). Diesem Ansatz folgend lassen sich die durch SPIM-FCS-Messungen generierten Autokorrelationskurven bei auch durch einen zweikomponentigen Fit normaler Diffusion auswerten. Aufgrund der bereits angesprochenen niedrigen Zeitauflösung und verringerter Datenqualität im anterioren Bereich erwies sich die Verwendung freier Fit-Parameter hierbei als problematisch, da vermutlich insbesondere die schnelle Komponente im Abfall der Autokorrelationskurve nur bedingt vom Fit-Algorithmus erfasst werden kann. Eine Eingrenzung der Fit-Parameter Grenzen für den Diffusionskoeffizienten der schnellen Fraktion auf den Bereich  $D_{\text{schnell}} = 2 - 20 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ , basierend auf unterstützenden konfokalen FCS-Messungen (durchgeführt und ausgewertet von Dirk Hofmann [141]) führte hierbei zu stabileren Fit-Ergebnissen. Die so erhaltenen Werte der langsamen Fraktion  $\rho_{\text{langsam}}$  sind entlang der anterior-posterior-Achse als Mittelwerte aller Messungen zu den jeweiligen Zeitpunkten in Abb. 7.10 aufgetragen.



**Abb. 7.10: Verteilung der langsamen Fraktion im frühen Embryo für unterschiedliche Zeitpunkte**

Gezeigt sind die aus mehreren Messungen gemittelten Fraktionen der langsamen Komponente entlang der anterior-posterior-Achse für unterschiedliche Zeitpunkte mit  $a = 650\text{nm}$ ,  $t_{\text{min}} = 1004\mu\text{s}$  und einer Binningstufe von 2 in  $x$ . Zum frühesten Zeitpunkt kurz nach der Befruchtung schwankt  $\rho_{\text{langsam}}$  um einen relativ konstanten Mittelwert von  $0,59 \pm 0,07$ . Die Verteilung verschiebt sich zum Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei durch eine Erhöhung des langsamen Anteils auf  $0,88 \pm 0,06$  auf posteriorer Seite, während der Anteil auf anteriorer Seite mit  $0,54 \pm 0,07$  relativ unverändert zum vorherigen Zustand bleibt. Zum Zeitpunkt des Einzellzustand bleibt der Verlauf der Anteile vergleichbar zum vorhergehenden Zustand, jedoch steigt der Anteil der schnellen Komponente über den gesamten Embryo um ca. 0,13. Daten aus [141]

Während für den Zeitpunkt kurz nach der Befruchtung eine entlang der AP-Achse annähernd konstante Verteilung der Fraktionen um einen Mittelwert von  $\rho_{\text{langsam}} = 0,59 \pm 0,07$  auftritt, zeigt sich zum Zeitpunkt des Treffens der Pronuklei bereits ein deutlicher Trend für eine Erhöhung der langsamen Fraktion auf posteriorer Seite. Während der Anteil der langsamen Fraktion auf der anteriorer Hälfte mit einem Mittelwert von  $\rho_{\text{langsam}} = 0,54 \pm 0,07$  zum Zeitpunkt kurz nach der Befruchtung vergleichbar bleibt, steigt der Anteil auf posteriorer Seite mit einem Mittelwert  $\rho_{\text{langsam}} = 0,88 \pm 0,06$  hier stark an. Ein ähnlicher Trend des Verlaufs ergibt sich für den Zeitpunkt des Einzellers, jedoch sinken hier die gemessenen Werte der langsamen Fraktionen über den gesamten Wurm hinweg zu niedrigeren Werten hin ab (siehe Tab. 6). Für die beiden



späteren Zeitpunkte ist die Form des Verlaufs der Fraktionen durch eine deutliche Veränderung innerhalb einer kurzen Längenskala von wenigen  $\mu\text{m}$  in der Mitte des Embryos, als der Trennlinie zwischen anteriorer und posteriorer Seite, gekennzeichnet anstatt eines kontinuierlichen Anstiegs vergleichbar zum Diffusionskoeffizienten bei der einkomponentigen Auswertung.

Zeitpunkt	Wertebereich $\rho$	$\rho_{\text{Gesamt}}$	$\rho_{\text{Posterior}}$	$\rho_{\text{Anterior}}$
Kurz nach Befruchtung	0,47 – 0,73	$0,59 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,05$
Treffen der Pronuklei	0,45 – 0,98	$0,71 \pm 0,18$	$0,88 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,07$
Einzeller	0,33 – 0,87	$0,58 \pm 0,16$	$0,73 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,05$

**Tab. 6: Fraktionen der langsamen Komponente nach Zeitpunkten**

Die Tabelle beinhaltet die Wertebereiche der langsamen Fraktion einer zweikomponentigen Auswertung normaler Diffusion zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Des weiteren sind die Mittelwerte mit Standardabweichung über die Gesamtlänge sowie in der posterioren bzw. anterioren Hälfte des Embryos angegeben (siehe auch Abb. 7.10).

### Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen der SPIM-FCS-Messungen an PIE-1 lassen sich nun die nachfolgende Aussagen ableiten. Im Rahmen der einkomponentigen Auswertung steigt der Diffusionskoeffizient auf anteriorer Seite von einem zunächst mit der posterioren Seite vergleichbarem Wert an. Dies spricht gegen die Deutung von Daniels et al, die eine Erniedrigung der Diffusion auf posteriorer Seite vorschlagen [36], und liefert vergleichbare Ergebnisse mit früheren FCS-Studien [169], trotz vergleichsweise erhöhter Werte der SPIM-FCS-Messungen auf posteriorer Seite und einer fehlenden Untersuchung einer möglichen Anomalie. Eine zweikomponentige Auswertung zeigt eine Erhöhung der langsamen Fraktion auf posteriorer Seite und gibt tendenziell eine ähnliche Verteilung zu früheren Studien wieder [36], zeigt jedoch einen vergleichsweise niedrigeren Anteil der schnellen Fraktion auf anteriorer und posteriorer Seite, was in der bereits oben erwähnten limitierenden Zeitauflösung der SPIM-FCS-Messungen begründet sein kann. Nach derzeitigem Verständnis verursacht ein zunächst etablierender PAR-3/6-Gradient auf dem Cortex weitere Gradienten von PAR-2 und PAR-1, welches letztendlich den zytoplasmischen Konzentrations- und Diffusionsgradienten von MEX-5/6 in Form einer erhöhten Konzentration bei niedrigerem Diffusionskoeffizienten auf anteriorer Seite induziert. MEX-5/6 sorgt nun für den untersuchten, zu MEX-5/6 inversen, Gradienten des Proteins PIE-1 der Konzentration und Diffusion [33, 36, 169, 170]. RNAi-Experimente an den beteiligten Proteinen bestätigen diese Annahme, da ein *Knockdown* dieser Proteine zu einer Gleichverteilung von PIE-1 im frühen Embryo [36, 169] führte. Das Diffusionsverhalten von PIE-1 in MEX-5/6-Mutanten zeigte hierbei eine starke Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten auf anteriorer Seite auf einen Wert von  $D_{\text{Anterior}} = (0,82 \pm 0,12) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  bei einem zum Wildtyp vergleichbarem Wert auf posteriorer Seite von  $D_{\text{Posterior}} = (0,63 \pm 0,10) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  [169]. Dies deckt sich mit der Beobachtung eines weitgehend konstanten Wertes des Diffusionskoeffizienten entlang der anterior-posterior-Achse aus SPIM-FCS-Messungen im Zustand kurz nach der Befruchtung. Somit erscheint es plausibel, dass die zeitlich frühere entstehende Erhöhung der Konzentration von MEX-5/6 im anterioren Ende zur dortigen nachfolgenden Erhöhung des Diffusionskoeffizienten von PIE-1 führt. Dies wird derzeit mit dem Modell einer kompetitiven Bindung der Proteine an zytoplasmischer RNA erklärt, die zu einer Erniedrigung der Proteindiffusion führt. Bei einer erhöhten MEX-5/6-Konzentration besetzen diese die zur Verfügung stehenden RNA-Moleküle, woraufhin sich die Diffusion von PIE-1 lokal erhöht. Dieses Modell wird unterstützt durch Diffusionsmessungen an anderen RNA-affinen Proteinen wie POS-1 und MEX-1, die eine vergleichbare MEX-5/6-abhängige beschleunigte Diffusion zeigen [169]. Die sichtbare Bindung

von PIE-1 an *P granules*, welche in Form von Tropfen aus RNA und Proteinen ebenfalls eine posteriore Kondensation zeigen, führte zu einem früherem Modell, innerhalb dessen die Entstehung des Konzentrationsgradienten von PIE-1 durch die Bindung an besagten *P granules* erklärt wurde. Messungen an *pptr-1*-Mutanten, die eine Gleichverteilung der *P granules* im Embryo bei weiterhin bestehendem PIE-1-Konzentrationsgradienten zeigten, weisen dieses Modell jedoch als unzureichend aus [171]. Selbst bei einer Gleichverteilung der als Bindungspartner zur Verfügung stehenden RNA im Zytoplasma würde in dem Modell einer kompetitiven Bindung ein zytoplasmischer MEX-5/6-Gradient den weiterhin entstehenden PIE-1-Gradienten erklären. Die hier gezeigten Ergebnisse der zweikomponentigen Auswertung stimmen in der Erhöhung der Fraktion der langsamen Komponente auf posteriorer Seite mit der Theorie überein, da hier durch die erniedrigte MEX-5/6-Konzentration nun mehr Bindungspartner frei werden würden. Dazu im Widerspruch steht die Erwartung einer Erhöhung der Fraktion der schnellen Komponente im anterioren Teil, welche sich aus den gezeigten Daten nicht ergibt, jedoch durch die Ergebnisse für die Verteilung der Fraktionen aus Messungen früherer Studien unterstützt wird [36].

Die hier vorgestellte Möglichkeit durch SPIM-FCS-Messungen die örtliche Variation der Proteinindiffusion über den kompletten Embryo hinweg zu mehreren Zeitpunkten erfassen zu können liefert neben der Bestätigung früherer FCS-Studien, die räumlich und zeitlich limitiert waren, nun auch ein Werkzeug um die Gradientenentwicklung in allen relevanten Dimension verfolgen zu können. Zukünftige am Lehrstuhl geplante Diffusionsmessungen an den oben genannten Proteinen, welche direkten und indirekten Einfluss auf den PIE-1-Gradienten besitzen, insbesondere MEX-5/6 und PAR-1, sollten im Zusammenhang mit einer Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Konzentrations- und Diffusionsgradientenentwicklung und unter Zuhilfenahme von Simulationen neue Einsichten und eventuelle Anpassungen bereits vorhandener Modelle liefern können.

---

---

---

Teil III.

## Entwicklung und Einsatz eines SD-FRAP-Ablations-Aufbaus

## 8. SD-FRAP-Ablations-Aufbau

*Dieses Kapitel befasst sich mit der Konzeptionierung, der Konstruktion und der Charakterisierung eines Mikroskopaufbaus, der auf der Verwendung eines bereits am Lehrstuhl vorhandenen kommerziellen Epifluoreszenzmikroskops basiert. Durch die Kombination einer neuen Spinning-Disk (**SD**)-Einheit und eines separaten Strahlengangs wird die Möglichkeit einer strukturierten Beleuchtung zur Durchführung von Aufnahmen nach dem ISM-Prinzip [86] geschaffen. Der separate Strahlengang sowie bauliche Veränderungen am Mikroskop ermöglichen zudem die Einkopplung eines zweiten Anregungsstrahlengangs, der die Positionierung eines Laserfokus in der Probenebene erlaubt. Dies wird sowohl für die Realisierung von **FRAP**- als auch **Ablations**experimenten verwendet. Dieser Aufbau wird im Weiteren als **SD-FRAP-Ablations-Aufbau** bezeichnet. Die Entwicklung dieses Versuchsaufbaus fand im Rahmen eines Antrags für Forschungsgroßgeräte statt. Konzeptionierung, Aufbau und Kalibration, Programmierung der Kontrollsoftware sowie Messungen und Evaluation von Daten zur Aufbaucharakterisierung wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Bei einzelnen Kalibrationsschritten sowie der Entwicklung einer Klimakammer für den Aufbau wurde der Autor vom Doktoranden Lorenz Stadler unterstützt.*

### Zielsetzung

Das Anforderungsprofil des zweiten im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbaus besteht aus den nachfolgenden Punkten:

- höchstauflösende Fluoreszenzmikroskopie über eine Spinning-Disk-Einheit in Kombination mit einer Modulation des Anregungslichts (ISM)
- FRAP-Strahlengang zur Durchführung von Bleichexperimenten mit frei wählbarer ROI
- Ablationsstrahlengang zur Durchführung minimalinvasiver Ablationsexperimente auf der  $\mu\text{m}$ -Skala

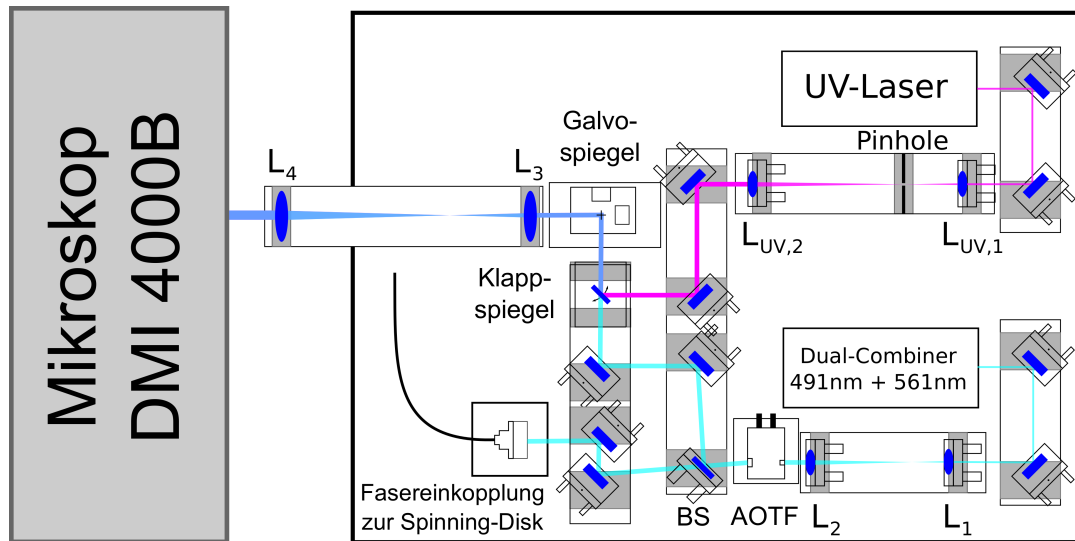
Dies soll in zukünftigen Projekten am Lehrstuhl neben der Untersuchung der Topologie biologischer Netzwerke unter erhöhter Auflösung auch neue Möglichkeiten zur Probenmanipulation, insbesondere im Kontext der Untersuchung der frühen Embryogenese von *C. elegans*, schaffen und die schonenden Langzeitaufnahmen des zuvor vorgestellten SPIM-Aufbaus entsprechend ergänzen.

### 8.1. Hardware-Setup

#### Mikroskopstativ, Spinning-Disk und Kamera

Grundlage des Aufbaus bildet das kommerzielle Mikroskopsystem eines *DMI4000B* der Firma Leica Microsystems. Dieses verfügte in der vorliegenden Konfiguration bereits über nachfolgende Bestandteile:

- manueller Objektivrevolver
- Epifluoreszenzanregung und -detektion über eine Fluoreszenzlampe (*EL6000*, Leica Microsystems) mit Intensitätsfilterung und motorisiertem Filterwürfelrevolver
- Wechsel der Signaldetektion zwischen einem Kamera-Port und Okularen über ein manuell verstellbares Prisma
- Durchlicht-Hellfeldbeleuchtung mit Kondensorlinse, Apertur- und Feldblende



**Abb. 8.1: Skizze des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus**

Die Strahlen der beiden Laser im sichtbarem Bereich werden über zwei Spiegel auf einen Teleskopaufbau aus den Linsen  $L_{1,2}$  gelenkt und dort aufgeweitet und kollimiert. Der nachfolgende AOTF dient zur schnellen Intensitätsmodulation der gebeugten ersten Mode. Ein Strahlteiler (BS) koppelt einen Teil der Strahlintensität aus. Der transmittierte Anteil wird über zwei weitere Spiegel in eine optische Faser eingekoppelt, der zur Anregung im Spinning-Disk System genutzt wird. Der reflektierte Anteil wird über zwei Spiegel auf ein Galvospiegelpaar gelenkt. Über die Linsen  $L_{3,4}$ , die mit dem Galvospiegelpaar und dem nachfolgenden Objektiv im Mikroskop nach dem telezentrischem Prinzip ausgerichtet sind, können die Laserlinien weiter aufgeweitet und der Laserfokus für Bleich-Experimente in der Probe positioniert werden. Zur Durchführung von Ablations-Experimenten wird der Strahl eines gepulsten UV-Lasers zunächst über zwei Spiegel und einen Teleskopaufbau aus den Linsen  $L_{UV,1,2}$  aufgeweitet und kollimiert. Ein *Pinhole* im Fokus des Teleskopstrahlenganges bereinigt das Strahlprofil des UV-Lasers. Über weitere Spiegel und einen ansteuerbaren Klappspiegel kann der Strahl anschließend auf die gleiche Strahlachse gebracht werden, die auch für die Bleichexperimente genutzt wird. Nicht gezeigt ist die sich links am Mikroskopstativ befindliche Spinning-Disk-Einheit mit Kamera.

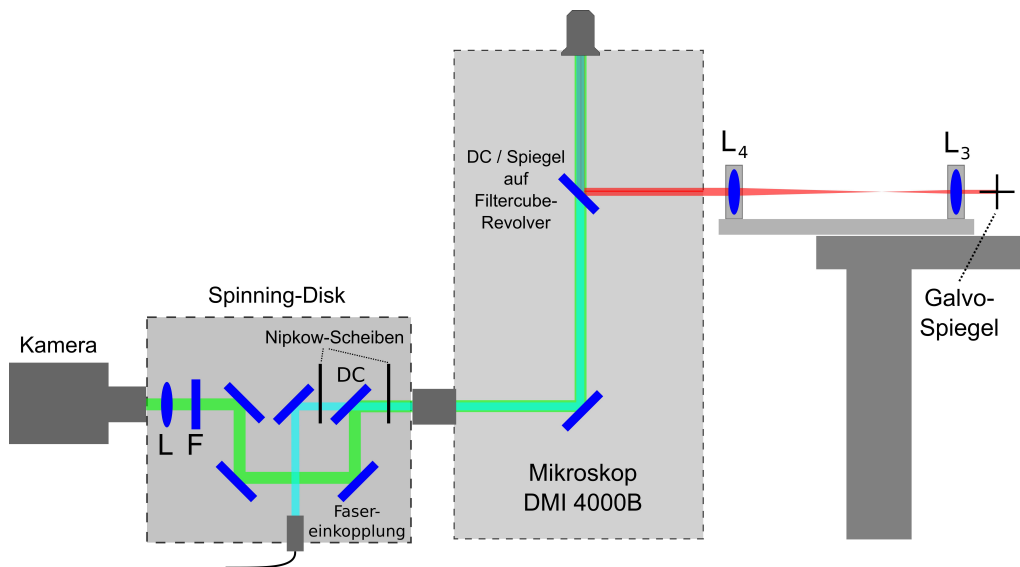
Eine Skizze des Strahlengangs des Aufbaus von oben bzw. von der Seite findet sich in Abb. 8.1 und Abb. 8.2. Eine Liste der verwendeten Bauteile und Bilder des Aufbaus finden sich im Anhang in Tab. 14 und Abb. D.3. Das Mikroskop, sowie die weiteren Teile des Versuchsaufbaus, befinden sich auf einem optischen Tisch *T1220C* (Thorlabs) auf vier passiv gedämpften Schwingungsisolatoren *PTH603* (Thorlabs). Für die Durchführung konfokaler Fluoreszenzaufnahmen wurde der Aufbau zunächst um eine Spinning-Disk-Einheit *CSU-X1-A1* der Firma Yokogawa Denki (Musashino, Japan) erweitert, indem diese an den Kamera-Port des Mikroskops angeschlossen wurde. Hierfür muss das Mikroskop-Stativ zunächst über passende Unterlegscheiben auf eine geeignete Höhe gebracht werden. Als Verbindung zwischen der Spinning-Disk-Einheit und dem Mikroskopstativ wird ein *Spectral 1530* (Leica Microsystems) verwendet, das eine zusätzliche Vergrößerung der Aufnahme um den Faktor 1,53 bewirkt. Um die Position des Mikroskopstativs insbesondere für eine spätere Einkopplung weiterer Strahlengänge auf dem optischen Tisch zu fixieren, wurden zusätzlich mehrere Winkel angebracht, die mit dem M6-Raster des Tisches verschraubt sind. Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wird erneut eine sCMOS-Kamera *ORCA-Flash4.0* verwendet. Das Anregungslicht wird in die Spinning-Disk-Einheit über eine optische Faser (*single-mode-fiber*) eingekoppelt und erlaubt somit eine konfokale Beleuch-

tung und Detektion. Die Epifluoreszenz- und Durchlicht/Hellfeld-Beleuchtung kann weiterhin über die Okulare z.B. zur Probenfindung und -positionierung verwendet werden. Es ist ebenso möglich die Detektion für diese beide Beleuchtungs-Arten über die Spinning-Disk mittels der Kamera durchzuführen, jedoch muss hierfür das Detektionssignal durch die Nipkow-Scheibe mit dem *Pinhole-Array*, was aufgrund der so nicht gegebenen konfokalen Beleuchtungs-Detektions-Konfiguration zu einem Signalverlust von ca. 93% im Vergleich zu einer Aufnahme ohne das *Pinhole-Array* führt. Während dies für die Durchlicht/Hellfeld-Beleuchtung aufgrund des potentiell sehr hohen Signals keine größeren Probleme zur Folge hat, ist die Kameradetektion bei Epifluoreszenzaufnahmen nur bei sehr hohen Anregungsleistungen, bzw. langen Kameraintegrationszeiten oder hohen Binning-Stufen sinnvoll. Auf der Höhe des Filterwürfelrevolvers des Mikroskopstativs befindet sich eine Wartungsklappe zum Austausch der Filterwürfel. Die Abdeckung der Klappe wurde demontiert um einen zusätzlichen Zugang zum Strahlengang innerhalb des Mikroskopstativs zu ermöglichen. Basierend auf den Abmessungen der kommerziell erhältlichen Filterwürfel der Firma Leica Microsystems wurden neue Filterwürfel konzipiert und in den Werkstätten der Universität Bayreuth hergestellt. Diese ermöglichen eine Ablenkung des Strahlengangs für einen um 90° veränderten Einstrahlwinkel. Anstelle der Einfallrichtung der Fluoreszenzlampe von der Hinterseite des Mikroskops kann so bei der Wahl des passenden Filterwürfels eine Einstrahlrichtung von Seiten der abgenommenen Blende erfolgen. Zur Erleichterung der Probenfindung und um Bleich- und Ablationsexperimente in unterschiedlichen Probenstellen zu ermöglichen wurden zudem motorisierte Linearverschiebetische zur *xy*- und *z*-Positionierung der Probe am Mikroskop-Stativ eingebaut (*SCAN IM 130 x 85*, Märzhäuser Wetzlar und *Super Z*, Leica Microsystems). Dies unterstützt bzw. ergänzt die Fokus-Verschiebung in *xy* über die Galvospiegel und ermöglicht Stackaufnahmen sowie eine Kompensation eines Objektivbrennweitenunterschieds bei der Verwendung von Wellenlängen im UV- oder sichtbaren Bereich. Zur Anregung und Detektion wird ein Öl-Immersionsobjektiv *HCX PL APO 63x/1.40-0.60 OIL CS* verwendet (Leica Microsystems). Für Ablationsmessungen in wässrigen Proben steht zudem das Wasserimmersionsobjektiv *HCX PL APO 63x/1.20 W CORR CS2* (Leica Microsystems) zur Verfügung. Beide Objektive verfügen über eine Transmission > 40% für 355nm und > 80% für 400 – 800nm. Zur schnellen Probenfindung ist zudem das Luftobjektiv *N Plan 10x/0,25 PH 1* (Leica Microsystems) installiert.

### Breadboard-Aufbau und Spinning-Disk-Anregungsstrahlengang

In einem zweiten Bereich des Versuchsaufbaus wird zunächst eine Anpassung der Strahlachse der optischen Komponenten auf die Einkopplungshöhe des Filterwürfelrevolvers im Mikroskop durch die Verwendung eines Breadboards *MB7575/M* (Thorlabs) auf höhenverstellbaren Füßen (Eigenbau) ermöglicht. Die optischen Bauteile werden hierbei über das bereits in Kap. 4 beschriebene Owis-Reiter-Schienen-System ausgerichtet. Die beiden Strahlen eines *Cobolt Calypso* und *Cobolt Jive* (491nm und 561nm, jeweils 3 – 100mW Leistung) werden über die Verwendung eines *Dual Combiners* (Cobolt) auf die selbe Strahlachse gebracht. Beide Strahlen werden über Spiegel (*BB1-E02*, Thorlabs) umgelenkt und über einen Teleskop-Strahlengang (*AC254-50-A* und *AC254-150-A*, Thorlabs) aufgeweitet. Die Justage in diesem und den nächsten Schritten folgt hierbei der Beschreibung aus Unterkap. 4.1. Über einen AOTF (*AOTF<sub>n</sub>C-400.650*, AA Opto-Electronic (Orsay, Frankreich)) wird eine modulierbare gebeugte erste Mode der Strahlen zur schnellen Modulierung des Anregungslichts für konfokale Mikroskopieaufnahmen erzeugt. Der Strahl wird anschließend über einen Strahlteiler (*BSW10*, Thorlabs) aufgespalten (siehe Tab. 15 im Anhang für eine Übersicht der Laserleistungen in unterschiedlichen Abschnitten des Aufbaus). Ein Teil des Strahles wird über zwei weitere Spiegel umgelenkt und über einen Laserstrahl-Koppler (*60SMS-1-4-M8-33*, Schäfter+Kirchhoff) in eine optische Faser eingekoppelt und mit der Spinning-Disk-Einheit verbunden.





**Abb. 8.2: Skizze des SD-FRAP-Ablations-Aufbau (Seitenansicht)**

Gezeigt ist ein Ausschnitt des Aufbaus in Abb. 8.1 in einer Seitenansicht. Die Laserlinien für Bleich- und Ablationsexperimente werden wahlweise über einen Dichroiten oder einen Spiegel auf einer angepassten Filterwürfelhalterung im Mikroskop vertikal nach oben auf die hintere Brennebene des Objektivs gelenkt. Durch eine Auslenkung der Strahlen über das Galvospiegelpaar könne so die Foki in der Probe bewegt werden. In einer SD-Mikroskopaufnahme wird das durch die Faser eingekoppelte Laserlicht zunächst durch die beiden Nipkow-Scheiben geführt und die Anregungsfoki über das Objektiv in der Probe erzeugt. Das so detektierte Signal geht nach dem konfokalen Prinzip zurück durch die erste Nipkow-Scheibe mit dem *Pinhole-Array* und wird über ein Dichroiten (DC) und weitere Spiegel zunächst über einen wählbaren Filter *F* in einem Filterrad wellenlängenabhängig transmittiert. Eine Tubuslinse *L* bildet das Signal auf den Kamerasensor ab.

### FRAP-Anregungsstrahlengang

Der über den Strahlteiler ausgekoppelte Teil des Strahlengangs wird über zwei weitere Spiegel abgelenkt und trifft auf das galvanometrische Spiegelpaar (6210HSM60 mit 5mm XY Mirror Set Protected Aluminum Coating, Cambridge Technology). Der entstandene Höhen-Unterschied der Strahlachse nach dem Galvospiegelpaar wird über Abstandshalter zwischen der nachfolgenden Schiene und dem optischem Tisch ausgeglichen. Entsprechend dem telezentrischem Prinzip werden in den entsprechenden Brennweitenabständen zwei Sammellinsen (LB1309-A und LB1917-A, Thorlabs) verwendet, um den Strahl erneut aufzuweiten, die Kollimation der Strahlen sicherzustellen und die Strahlauslenkung nach dem Galvospiegelpaar in eine Verschiebung des Strahlfokus in der Probenebene abzubilden. Hierbei ist insbesondere darauf zu achten, den Abstand der letzten Sammellinse zur Position der BFP des Objektivs geeignet zu wählen, da dieses selbst zum Fokussieren der Probe bewegt werden kann. Dies wird durch die Wahl einer Standardposition des Objektivs für die üblicherweise verwendeten Probenhalter erreicht. Eine Änderung der Probenhöhe kann stattdessen über das *Super z* System erreicht werden, welches die Objektivposition unverändert lässt. Die Umlenkung der Strahlen um 90° auf die hintere Objektivapertur erfolgt über einen, auf einem gedrehten Filterwürfel montierten, Dichroiten Di02-R561-22x29 (Semrock) mit einer Reflexion > 90% für 350 – 554nm und einer Transmission > 93, für Wellenlängen > 579nm. Dies ermöglicht die gleichzeitige Betrachtung der angeregten Fluoreszenz bzw. der Fokusposition während des Bleichvorganges. Der Aufbau besitzt eine um den Faktor 8 – 10 höhere Anregungsleistung für den FRAP-Fokus im Vergleich

zur Anregung über die Spinning-Disk-Einheit zur Bildaufnahme, gemessen am unfokussierten Strahl an der hinteren Objektivapertur (siehe Tab. 15 im Anhang).

### UV-Anregungsstrahlengang

Für Ablationsexperimente wird zunächst der Strahl eines gepulsten 355nm *Q-Switched Solid State*-Lasers (*6FTSS355-Q3-STA*, Leistung  $> 15\mu\text{J}$  @ 1kHz, Pulsdauer  $< 1.1\text{ns}$ , CryLas) über zwei Spiegel (*BB1-E01*, Thorlabs) umgelenkt und über einen Teleskopaufbau aus zwei Sammellinsen (*LA4052-A* und *LA4102-A*, Thorlabs) aufgeweitet und kollimiert. Aufgrund eines verformten Strahlprofils aus dem Laser und zur Steigerung der Genauigkeit bei Ablationsvorgängen wird zur Reinigung des Strahlprofils ein  $50\mu\text{m}$ -*Pinhole* (*LB 50-D5-G25*, Owis) im Brennpunkt des Teleskopaufbaus positioniert. Im weiteren Strahlverlauf lenken zwei weitere Spiegel den Strahl auf einen Klappspiegel (*KSHM 40-RE-MDS*, Owis), der den Wechsel zwischen FRAP- und Ablationsexperimenten ermöglicht. Nach dem Klappspiegel liegt der Strahlengang des Ablationslasers auf dem gleichen Strahlengang des FRAP-Anregungsstrahlengangs. Wellenlängenabhängige Unterschiede der Fokussierung bzw. Kollimation im Teleskopaufbau nach den Galvospiegeln zwischen dem FRAP-Strahlengang mit sichtbarer Wellenlänge und dem Ablationsstrahlengang im UV-Bereich können durch eine Variation der Linsenabstände im ersten Teleskopaufbau des Ablationsstrahlengangs kompensiert werden, während eine wellenlängenabhängige Veränderung der Objektivfokusposition in der Probe über die Probenpositionierung in  $z$  berücksichtigt werden kann. Zur gleichzeitigen Bildaufnahme während eines Ablationsvorgangs steht in einem gedrehten Filterwürfel ein Spiegel *MIRROR 4-6 WAVE 22 X 29MM* der Firma Edmund Optics (Karlsruhe, Deutschland) sowie neuerdings ein Dichroit (*Di02-R405-22x29*, Semrock) mit einer Reflexion  $> 90$  für 350–372nm und einer Transmission  $> 93\%$  für 417–900nm zur Verfügung. Die in dieser Arbeit gezeigten Ablationsmessungen wurden alle unter Verwendung des Spiegels erstellt.

## 8.2. Aufbauansteuerung, Kontrollsoftware und Datenverarbeitung

### Ansteuerungskomponenten

Zur Ansteuerung des Messaufbaus wird ein *CELSIUS W530 Power* (Fujitsu) mit 16 GB Arbeitsspeicher, einen *Intel® Xeon® Processor E3-1620V3 @ 3.50 GHz* -Prozessor und einem *Windows 7 Professional 64-bit* -Betriebssystem verwendet. Die Kommunikation mit einem Teil der im Messaufbau verbauten Komponenten geschieht über serielle Kommunikation mittels USB- oder RS-232-Anschlüssen. Zur Verarbeitung analoger und digitaler Eingangs- und Ausgangssignale, sowie zur Sicherstellung der Synchronisierung der einzelnen Komponenten wird eine Multifunktions-RIO-Karte (rekonfigurierbare Input/Output) *NI PCIe-7842R* mit einem anwenderprogrammierbaren FPGA (*Field Programmable Gate Array*) und drei *SCB-68A Connector Blocks* verwendet (National Instruments). Durch Einladen eines Steuerprogramms auf das FPGA können dort logische Schaltungen erzeugt werden und das Messprogramm kann entkoppelt von dem Betriebssystem des Messrechners ablaufen. So können die notwendigen Kriterien an die Synchronisierung und die zeitkritische Ansteuerung von Komponenten verlässlich erreicht werden. Über die *LabVIEW*-Umgebung (*LabVIEW 2012 Version 12.0*, 32bit) erfolgt die Programmierung des FPGA, sowie die Erstellung einer messrechnerbasierten Komponentenansteuerung über serielle Kommunikation, die Erstellung einer Benutzeroberfläche und die notwendige Kommunikation zwischen Messrechner, Komponenten und FPGA. Die Kamera wird über die Software *HoKaWo* (V2.10) angesteuert unter Zuhilfenahme von Triggersignalen zur Synchronisation der Kameraaufnahmen. Die einzelnen angesteuerten Komponenten sind wie folgt:

- Mikroskopstativ: *Leica DMI4000B* (seriell. Kommun.)
- Spinning-Disk-Einheit: *CSU-X1-A1* (seriell. Kommun.)
- Anregungslaser: *Cobolt Calypso / Jive* (seriell. Kommun.)
- Ablationslaser: *6FTSS355-Q3-STA* (seriell. Kommun.)
- AOTF: *AOTF<sub>n</sub>C-400.650* (Analoge Ausgangssignale über *FPGA*)
- Klappspiegelhalter: *KSHM 40-RE-MDS* (TTL-Signal über *FPGA*)
- Galvanometerspiegelpaar (analoge Ausgangssignale über *FPGA*)
- Probenpositionierer *xy*: *SCAN IM 130 x 85* (seriell. Kommun.)
- Probenpositionierer *z*: *Super Z* (analoge Ausgangssignale über *FPGA*)
- Kamera: *ORCA-Flash 4.0* (TTL-Triggersignale über *FPGA*)

### Messprogramm

Das Messprogramm besteht zum einen aus einer graphischen Oberfläche zur Eingabe der Aufnahmeparameter. Ein Bild der Benutzeroberfläche mit einer detaillierte Behandlung der einzelnen Übergabeparameter und Anzeigen findet sich im Anhang dieser Arbeit in Abschnitt B. Der messrechnerbasierte Programmteil bewerkstelligt in einem *Master*-Programm die Ansteuerung von Komponenten über serielle Kommunikation zur Synchronisation zeitunkritischer Abläufe sowie die Weitergabe von benutzerdefinierten Übergabeparametern an den *FPGA*-basierten Programmteil. Dieser ist verantwortlich für die zeitkritische Synchronisation und Ansteuerung von Komponenten über analoge oder digitale Spannungssignale (siehe Abb. 8.3). Das Programm selbst verfügt über unterschiedliche Aufnahmemodi zur Durchführung von:

- Einzelbild- und Langzeitaufnahmen mit definierten Zeitabständen / Stack-Aufnahmen mit definierten Schichtabständen
- Mehrkanalaufnahmen in allen obigen Variationen (Durchlicht, Epifluoreszenz, Konfokal)
- Bleichexperimenten mit variabler ROI sowie *pre-Bleach*- und *post-Bleach*-Bildaufnahmen
- Ablationsexperimente mit variabler ROI mit *pre-Ablation*- und *post-Ablation*-Bildaufnahmen
- ISM-Aufnahmen (separater Programmteil)

Die Messparameter und Bleich- und Ablationsereignisse können zudem innerhalb des Programms auch während einer Live-Aufnahme getestet werden.

Die Eingabeparameter der Benutzeroberfläche sind wie folgt::

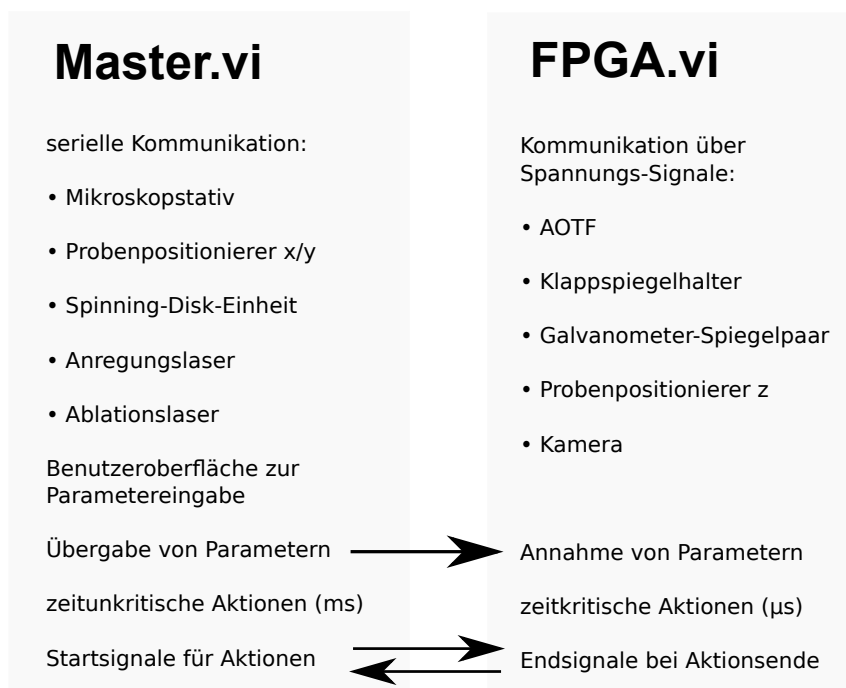
- Filterwürfelstellung, Anregungsmodalität, Leuchtquellenintensität,
- SD-Geschwindigkeit, -Detektionsfilter, -Shutter-Position
- *z*-Position der Probenpositionierung
- Laserleistung der beiden Anregungslaser
- Pulsrate und -Anzahl des Ablationslasers

- *Blanking* und Modulation des AOTF
- Parameter zur Langzeit- bzw. Stack-Aufnahme und für Mehrkanalmessungen (Bild- bzw. Stack-Anzahl, Zeitabstand, Schichtabstand, Einstellungen von Mehrkanalmessungen unterschiedlicher Anregung/Detektion)
- Parameter zur Durchführung von Bleich- und Ablationsexperimenten (*pre-* und *post-Bleach*-Bildanzahl, Bleich- und Bildgebungslaserleistung/-wellenlänge)
- Positionskontrolle der Galvospiegel zur Fokuspositionierung und Oberfläche zur Eichung der Fokusposition und Erstellung von zeitlichen Abläufen mehrerer Fokuspositionen für Bleich- und Ablationsexperimente

Ein separates Messprogramm zur Erstellung höchstauflösender ISM-Mikroskopaufnahmen beinhaltet:

- Aufnahme- und Beleuchtungsparameter zur Erstellung einer ISM-Aufnahme (Stroboskop-pulsanzahl, Stroboskoppulsdauer)

Vor dem Beginn einer Langzeitmessung muss innerhalb der Bildaufnahme-Software *HoKaWo* ein *Live-Stream* bekannter Frame-Anzahl eingestellt und die Kamera bei getriggelter Aufnahme in einen externen Trigger-Modus (*Level* für ISM-Aufnahmen, *Edge* für andere Aufnahmemodi) geschaltet werden. Nach Beginn der Aufnahme in der *HoKaWo*-Software kann die Messung über die *LabVIEW*-Software gestartet werden.



**Abb. 8.3: Programmstruktur der SD-FRAP-Ablations-Aufbauansteuerung**

Zeitunkritische Aktionen sowie die serielle Kommunikation erfolgt über den Messrechner bzw. den dort operierenden *Master*-Programmteil. Zeitkritische Aufgaben, insbesondere bei der Synchronisierung unterschiedlicher Gerätefunktionen, übernimmt das extern ablaufende Programm auf dem FPGA. Für die notwendige Übergabe von Parametern und zur Anzeige abgeschlossener Programmabschnitte erfolgt zwischen den beiden Programmen bei Bedarf eine Kommunikation.

Nach Ende der Aufnahme werden die Daten innerhalb der *HoKaWo*-Software als *Image-Stack* abgespeichert und können zur weiteren Datenverarbeitung auf Fremdrechner exportiert werden. Der eigentliche Messablauf besteht aus einer Abfolge von Warteschleifen bzgl. des Triggersignals der Kamera zur Anzeige der Aufnahmebereitschaft, der Einstellung der Laserleistung während der Belichtungszeit der Kamera, Probenpositionierung, Kanalauswahl bzw. Filteränderungen im Mikroskopstativ und der SD-Einheit, sowie dem Abfahren der vorher eingestellten FRAP- und Ablationsfokuspositionen während der Bleich- und Ablationsvorgänge. Während einer ISM-Messung werden die Zeitpunkte der Anregungslaserpulse zeitlich zum ausgelesenen Signal der Nipkow-Scheibenstellung berechnet und durchgeführt [86]. Die Belichtungszeit der Kamera wird hierbei im Trigger-Modus *Level* für den Zeitraum einer einzelnen Stroboskopaufnahme über die Dauer des an die Kamera angelegten Triggersignals des FPGA gesteuert.

### Datenverarbeitung

Die durch den Aufbau generierten Bilddaten können in alle gängigen Bilddateiformaten exportiert werden. Die weitere Datenverarbeitung der getätigten Aufnahmen erfolgt über *Matlab*-basierten Auswerteskripte oder *Fiji*. Details zur Datenverarbeitung und -evaluation finden sich projektbezogen in den entsprechenden Unterkapiteln von Kap. 9.

## 8.3. Kalibration und Aufbaucharakterisierung

### Pixelgröße und Auflösung

Die Pixelgröße in der Bildebene ergibt sich aus der physischen Pixelgröße auf dem Kamerasensor ( $6,5\mu\text{m}$ ) und der Vergrößerung durch die Optik. Neben der 63-fachen Vergrößerung des verwendeten Objektivs kommt hier zusätzlich eine Vergrößerung um den Faktor 1,53 durch den verwendeten C-Mount-Anschluss zwischen der CSU-X1 und dem Mikroskopstativ, sowie eine Vergrößerung um den Faktor 1,2 innerhalb der CSU-X1. Dies resultiert in einer theoretischen Pixelgröße von  $a_{theo} = 6,5\mu\text{m}/(63 \cdot 1,53 \cdot 1,2) = 56,2\text{nm}$ . Eine Kalibrationsmessung an einer  $\mu\text{m}$ -Eichskala ergibt einen Wert von  $a_{exp} = 57,1 \pm 1,6\text{nm}$ . Zur Bestimmung der Auflösung und einem späterem Vergleich der potentiellen Auflösungssteigerung in ISM-Messungen (siehe Unterkap. 9.1) wird, wie bereits in Unterkap. 4.3 beschrieben, eine Stackaufnahme einer Beadsprobe in 1%-Agarose ausgewertet. Die gemessenen Werte für das hierfür verwendete Ölimmersionsobjektiv sind zusammen mit den theoretisch erwarteten Werten nach Unterkap. 3.1.6 in Tab. 7 gelistet. Die gemessenen Werte stimmen im Rahmen der Fehler mit den theoretisch erwarteten Werten überein.

$\lambda_{Det} = 500 - 550\text{nm}$			
$\sigma_{xy,theo}[\text{nm}]$	$\sigma_{xy,exp}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,theo}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,exp}[\text{nm}]$
224	$235 \pm 18$	840	$847 \pm 87$

$\lambda_{Det} = 575 - 625\text{nm}$			
$\sigma_{xy,theo}[\text{nm}]$	$\sigma_{xy,exp}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,theo}[\text{nm}]$	$\sigma_{z,exp}[\text{nm}]$
250,5	$260 \pm 22$	938	$910 \pm 82$

**Tab. 7: Theoretische und gemessene Werte der lateralen und axialen Auflösung**

Gezeigt sind die nach Unterkap. 3.1.6 erwarteten theoretischen Werte der Auflösung für 515nm bzw. 575nm, sowie die experimentell bestimmten Werte der lateralen Auflösung und axialen Auflösung für Detektion im Bereich 50–550nm bzw. 575–625nm für das verwendete Ölimmersionsobjektiv. Die experimentellen Werte liegen hierbei im Bereich der theoretisch erwarteten Werte.

### Bleichfokusgröße und -positionierung

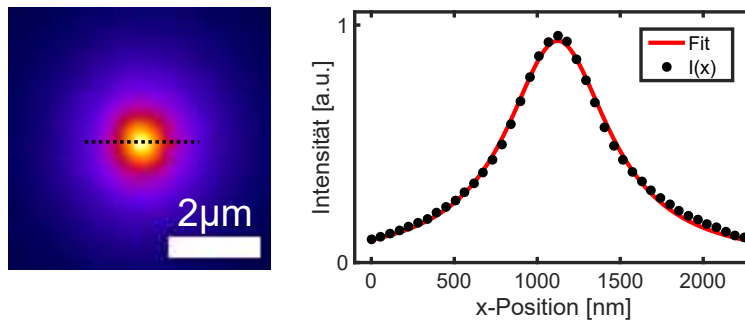
Zur Vermessung der Bleichfokusgröße wird eine homogen fluoreszierende Probe in Form eines *Chromaslide* (Chroma Technology Corporation, Vermont, USA) verwendet. Der Fokus wird hierbei über den Dichroiten *Di02-R561* in die Proben eingebracht und die im Fokus angeregte Fluoreszenz aufgenommen. Ein Beispiel einer solchen Aufnahme ist zusammen mit einem Intensitätsprofil entlang einer Linie durch den Fokus in Abb. 8.4 gezeigt. Das Intensitätsprofil lässt sich durch ein Lorentz-Profil der Form  $I(x) = a/\pi(x^2 + a^2)$  fitten, mit einer daraus resultierenden Halbwertsbreite  $FWHM = 2a$  bzw. einer Auflösung gemäß  $\sigma_{FRAP} = FWHM/\sqrt{2\ln 2}$ . Die aus dem Fit bestimmte Größe der FRAP-Foki für die Verwendung des 491nm- und 561nm-Lasers betragen

$$\sigma_{xy,491nm} = (633 \pm 10)nm$$

und

$$\sigma_{xy,561nm} = (665 \pm 14)nm$$

und liegen somit oberhalb der oben bestimmten Detektionsauflösung  $\sigma_{xy}$ . Eine theoretische Größe der Ablationsfoki liegt nach Gl. 3.1 bei  $\sigma_{xy,491nm} = 288nm$  und  $\sigma_{xy,561nm} = 329nm$ . Ein größerer gemessener Wert entsteht aufgrund der nicht vollständigen Ausleuchtung der hinteren Objektvartur ( $\varnothing 12mm$ ), da der maximal erreichbare Strahldurchmesser aufgrund der zur Verfügung stehenden Größe der Bauteile im Inneren des Mikroskopstatis limitiert ist. Die  $700\mu m$  großen Strahldurchmesser der beiden Laserlinien werden im Aufbau um einen Faktor  $M = 12$  auf  $8,4mm$  aufgeweitet. Nach den Überlegungen aus Unterkap. Kalibration und Aufbaucharakterisierung führt dies zu einer Erniedrigung der NA des Objektivs und einer Anpassung der theoretisch erwarteten Werte auf  $\sigma_{xy,491nm} = 411nm$  und  $\sigma_{xy,561nm} = 470nm$ . Diese Werte liegen weiterhin unterhalb der gemessenen Werte, was sich mit einem Fehler der Abschätzung oder nicht berücksichtigter Effekte der verwendeten Optiken erklären lässt. Eine Abschätzung der Tiefe des Fokus nach Gl. 3.2, basierend auf den gemessenen Werten der lateralen Fokusgrößen, liefert Werte von  $\sigma_{z,491nm} = 5,2\mu m$  und  $\sigma_{z,561nm} = 5,0\mu m$ .



**Abb. 8.4: Bleichfokusgröße in Chromaslide**

Gezeigt ist die Aufnahme eines Bleichfokus des 491nm-Lasers in einem grünen Chromaslide. Rechts davon ist das Intensitätsprofil einer horizontalen Linie durch den Fokus (schwarz) mit einem Fit (rot) basierend auf einem Lorentz-Profil dargestellt. Die aus dem Fit berechnete Halbwertsbreite des Fokus beträgt hierbei  $FWHM = 758nm$  mit einer entsprechenden Auflösung von  $\sigma_{FRAP} = 644nm$ .

Als nächstes wird die laterale Verschiebung des Bleichfokus in Abhängigkeit zu der an den Galvospiegeln angelegten Spannung bestimmt. Hierfür wird die Position des Bleichfokus aus Aufnahmen an einem Chromaslide für unterschiedliche Spannungswerte anhand des Intensitätsprofils bestimmt. Aus den gemessenen Positionen ergibt sich ein Umrechnungsfaktor der

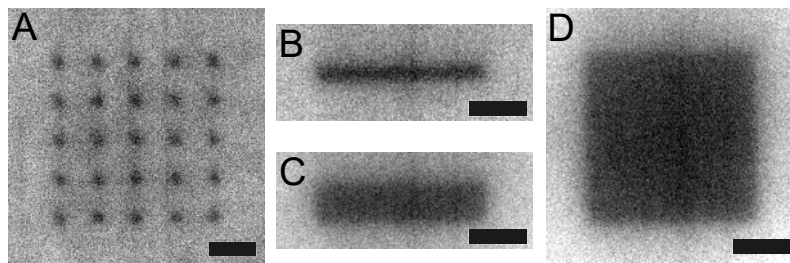
Fokusverschiebung von

$$(0,55 \pm 0,01) \frac{\text{Pixel}}{\text{mV}}$$

bzw.

$$(31,30 \pm 0,36) \frac{\text{nm}}{\text{mV}}$$

mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung der einzelnen gemessenen Verschiebungen. Diese Werte werden innerhalb der Kontrollsoftware für die pixelgenaue Positionierung der Foki verwendet. Zwischen den Position der Bleichfoki des 491nm- und 561nm-Lasers ist eine Fokusverschiebung von  $5 \pm 1$  Pixeln bzw.  $281 \pm 56$  nm festzustellen. Dies wird vermutlich durch einen leichten Versatz der beiden Strahlengänge innerhalb des *Dual Combiners* verursacht und kann in der Kontrollsoftware korrigiert werden um z.B. die gleichzeitige Verwendung beider Laserlinien in einem Bleichexperiment zu gewährleisten.



**Abb. 8.5: Unterschiedliche Bleichgeometrien**

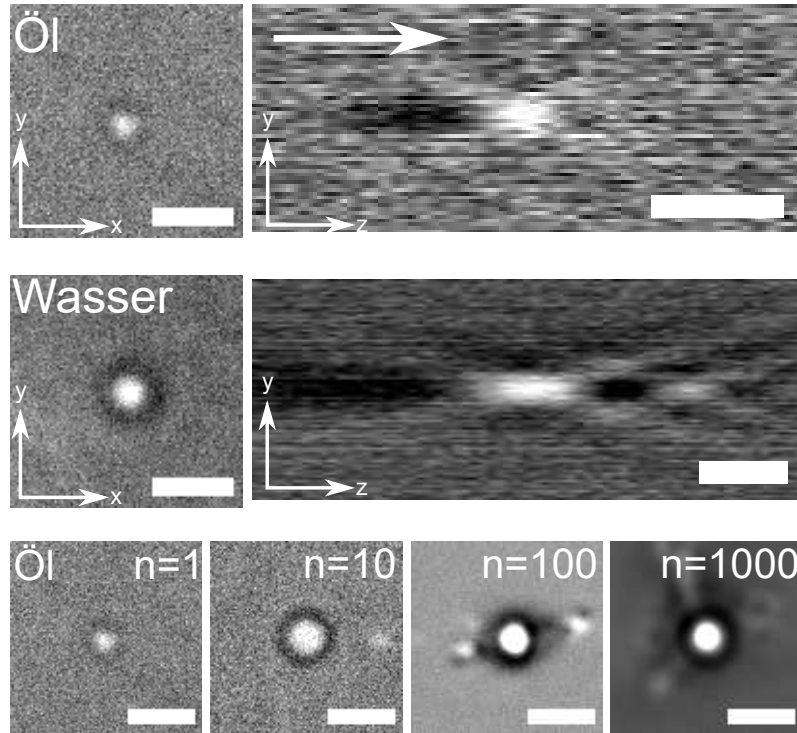
Gezeigt sind unterschiedliche durch einen 491nm gebleichte Regionen in einem grünen Chromaslide. Durch die Variation der Spannungsabfolgen können unterschiedliche Formen der gebleichten ROI ausgewählt werden: (A) Abfolge von  $5 \times 5$  einzelnen Bleichfoki mit einem Abstand von jeweils 30 Pixeln bzw.  $1,69 \mu\text{m}$  - (B) Eine Linie aus 20 Einzelfoki im Abstand von jeweils 5 Pixeln bzw.  $281 \text{ nm}$  - (C) Ein Rechteck aus  $20 \times 4$  Einzelfoki im Abstand von jeweils 5 Pixeln bzw.  $281 \text{ nm}$  - (D) Ein Quadrat aus  $20 \times 20$  Einzelfoki im Abstand von jeweils 5 Pixeln bzw.  $281 \text{ nm}$ . Die Wartezeiten der einzelnen Fokipositionen betrug jeweils 5ms bei voller Laserleistung. Die Längenskalen betragen  $2 \mu\text{m}$ .

Nach der Vermessung der Fokusgröße und der Umrechnung der Verschiebung lassen sich nun unterschiedliche Bleichregionen innerhalb der Kontrollsoftware eingeben. Beispiele für verschiedene Bleichgeometrien sind in Abb. 8.5 gezeigt. Das Bleichen einer ausgewählten ROI wird hierbei über das Einschwenken des Dichroiten in den Strahlengang realisiert. Das Muster wird in Form einzelner Bleichfoki abgefahren, wobei die Anzahl der Foki, ihr lateraler Abstand in der Bildebene und die einzelnen Wartezeiten an den Fokipositionen die Bleichintensität innerhalb der ROI festlegen. Für das Bleichen einer geschlossenen ROI wird dazu geraten, Abstände der Foki unterhalb der Halbwertsbreite des Fokusdurchmessers zu wählen. Eine engere räumliche Abtastung führt entsprechend zu einer erhöhten Bleicheffizienz. Die Anzahl der Foki und die Wartezeit an den einzelnen Fokuspositionen bestimmt die Dauer des Ablationsvorgangs, wobei eine Abwägung zwischen Bleicheffizienz und Zeitauflösung getroffen werden muss. Für weitere Details zur Durchführung von FRAP-Messungen siehe Unterkap. 9.2.

#### **Ablationsfokusgröße, Fokusverschiebung und -positionierung**

Zur Bestimmung der Fokusgröße des Ablationslasers wird durch einen UV-Laserpuls eine Mikrolinse in ein Deckglas hineingebrannt. Diese Methode wurde schon von anderen Gruppen zur Charakterisierung des Ablationsfokus in der Probe verwendet [172]. Hierbei ist darauf zu achten,

eine möglichst niedrige Intensität des Lasers bzw. eine geringe Anzahl an Pulsen zu verwenden, da ansonsten das Anwachsen des entstehenden Plasmas begünstigt wird und eine daraus folgende Photodisruption zu einem Bruch im Material bzw. einem wesentlich größerem Ablationsspot führt. Ein Beispiel für derartige Mikrolinsen für das bereits zuvor verwendete Ölimmersionsobjektiv und ein Wasserimmersionsobjektiv, welches für Ablationsvorgänge in tieferen Ebenen wässriger Proben verwendet werden kann, sind in Abb. 8.6 zu sehen.



**Abb. 8.6: Ablationsfoki in Glas**

Gezeigt sind Durchlichtaufnahmen der Ablationsfoki, die durch ein Öl- und ein Wasserimmersionsobjektivs entstanden sind. Die linke Aufnahme zeigt die durch den UV-Laserpuls entstehende Mikrolinse in der Fokusebene des Ablationslasers. Rechts daneben ist die Aufnahme in der  $yz$ -Ebene dargestellt. Der Pfeil zeigt die Richtung, aus der das UV-Laserlicht kommt. Die Durchlichtquelle bestrahlt die Probe dementsprechend von der gegenüberliegenden Richtung. Der Ablationsvorgang entstand jeweils durch einen einzelnen Puls bei der niedrigsten Intensität zur Entstehung der Mikrolinse statt (ca. 15% der maximalen Laserleistung für das Ölimmersionsobjektiv und volle Laserleistung für das Wasserimmersionsobjektiv). Für beide Objektive ist die entstandene Mikrolinse deutlich zu erkennen. Die  $yz$ -Darstellung zeigt die Entstehung einer zweiten, kleineren Linse hinter der ersten Linse bei der Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs, was vermutlich aufgrund von Aberrationen aufgrund des stark von Wasser abweichenden Brechungsindex des Glases zustande kommt. Dies ist demnach für Ablationsmessungen in wässrigen Proben wie Zellen nicht zu erwarten. Darunter dargestellt sind die entstehenden Ablationsfoki für eine erhöhte Pulsanzahl  $n$  bei einer Frequenz von  $f = 1\text{kHz}$ . Während zunächst nur ein Anstieg der Linsengröße zu beobachten ist, treten für Pulssequenzen von  $n \geq 100$  bereits Risse im Glas aufgrund einer entstandenen Photodisruption auf. Die eingezeichneten Längenskalen betragen jeweils  $2\mu\text{m}$ .

Ähnlich zur Bestimmung der PSF des Systems anhand von Beadsaufnahmen wird der Wert für  $\sigma_{\text{Ab}}$  aus einem Fit einer Gaußkurve an die entsprechenden Achsen der Aufnahmen der entstandenen Mikrolinse ermittelt. Die so erhaltenen Werte der lateralen und axialen Fokusgröße



sind

$$\sigma_{xy,\ddot{O}|} = (346 \pm 33)\text{nm}$$

$$\sigma_{z,\ddot{O}|} = (569 \pm 47)\text{nm}$$

bzw.

$$\sigma_{xy,\text{Wasser}} = (424 \pm 25)\text{nm}$$

$$\sigma_{z,\text{Wasser}} = (1759 \pm 82)\text{nm}$$

Eine theoretische Abschätzung der Fokusgröße nach Gl. 3.1 und 3.2 liefert Werte  $\sigma_{xy,\ddot{O}|} = 208\text{nm}$ ,  $\sigma_{z,\ddot{O}|} = 776\text{nm}$  und  $\sigma_{xy,\text{Wasser}} = 242\text{nm}$ ,  $\sigma_{z,\text{Wasser}} = 1056\text{nm}$ . Die gemessenen Werte der lateralen Auflösung liegen hierbei leicht oberhalb der theoretischen Werte, während die gemessene axiale Ausdehnung der Mikrolinse für das Ölimmerionsobjektiv unterhalb der theoretischen Erwartung liegt. Die axiale Ausdehnung ist für das Wasserimmersionsobjektiv größer als der theoretische Wert, was vermutlich wesentlich mit den abweichenden Brechungsindex von Glas und den darausfolgenden Aberrationen erklärt werden kann. Eine Anpassung der theoretisch erwarteten Werte aufgrund einer nicht vollständigen Ausleuchtung der hinteren Objektivapertur durch den auf einen Durchmesser von  $9,1\mu\text{m}$  vergrößerten UV-Strahl liefert Werte von  $\sigma_{xy,\ddot{O}|} = 274\text{nm}$  und  $\sigma_{z,\ddot{O}|} = 1349\text{nm}$ . Das Wasserimmersionsobjektiv wird mit einer hinteren Objektivapertur von  $9\text{mm}$  annähernd homogen ausgeleuchtet.

Die hier gemessene Fokusgröße zeigen die Möglichkeit einer Manipulation in der Probe unterhalb der  $\mu\text{m}$ -Skala. Die ermittelten Werte sind in derselben Größenordnung von Werten einer Publikationen mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau [172]. Die Tiefe des UV-Fokus liegt beim verwendeten Ölimmersionsobjektiv trotz einer achromatischen Korrektur leicht oberhalb der Bildebene. Der Höhenunterschied beträgt  $\Delta z_{\text{Abl},\ddot{O}|} = 1,3 \pm 0,3\mu\text{m}$  und wurde experimentell über die Erzeugung von Mikrolinsen und der verschobenen  $z$ -Position der Linsenmitte ermittelt. Während der Durchführung eines Ablationsexperiments wird die Probe daher vor den UV-Laserpulsen über die  $z$ -Stage um  $\Delta z_{\text{Ablation}}$  verschoben. Eine Verschiebung der Fokusposition für das UV-korrigierte Wasserimmersionsobjektiv konnte im Rahmen der Fehler nicht festgestellt werden.

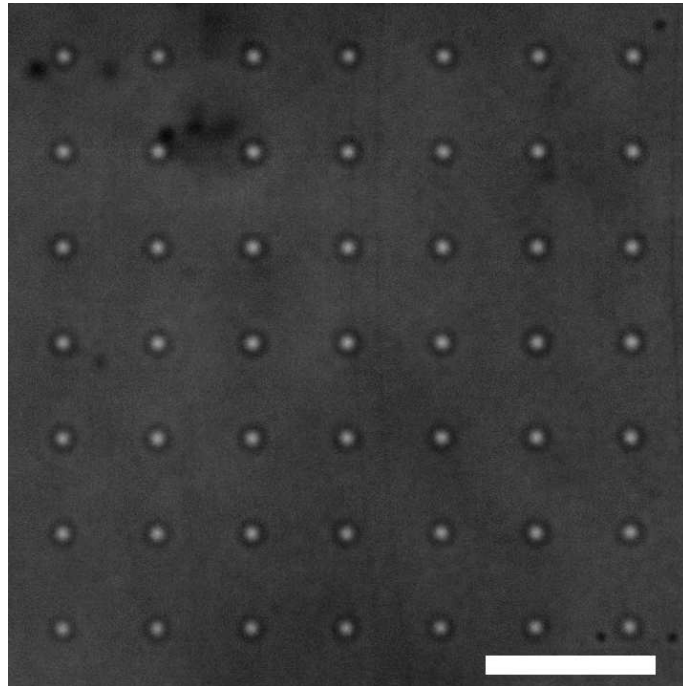
Um die Linearität der Auslenkung der Ablationsfoki zu überprüfen, wurde einzelne Mikrolinsen in einem Deckglas in einem  $7 \times 7$ -Raster in einem Bereich in der Mitte des zur Verfügung stehenden Gesichtsfeldes mit den Abmessungen  $(34 \times 34)\mu\text{m}^2$  verwendet (siehe Abb. 8.7). Die Abstände der Foki wurden durch eine Erhöhung der angelegten Spannung um je  $180,42\text{mV}$  an das Galvospiegelpaar vorgegeben. Die Linsen wurde durch das Wasserimmersionsobjektiv bei voller Leistung des UV-Lasers mit jeweils einem einzelnen Puls erstellt. Die einzelnen Ablationsfoki besitzen äquidistante Abstände von  $100\text{Pixeln}$  bzw.  $(5,62 \pm 0,05)\mu\text{m}$  und weisen innerhalb des gewählten Bereichs eine lineare Auslenkung gemäß der Spannung auf. Der Umrechnungsfaktor zwischen Fokusverschiebung und angelegter Spannung beträgt somit

$$(0,55 \pm 0,01) \frac{\text{Pixel}}{\text{mV}}$$

bzw.

$$(31,15 \pm 0,27) \frac{\text{nm}}{\text{mV}}$$

mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung der einzelnen gemessenen Verschiebungen. Die Fokuspositionen in  $z$  sind im Rahmen der Fehler der experimentellen Bestimmung auf selber Höhe in der Probe. Eine Wiederholung mit dem Ölimmersionsobjektiv bringt identische Werte. Zur Überprüfung der Fokuspunktverschiebung verfügt die Kontrollsoftware über eine intuitive Oberfläche zur schnellen Bestimmung der Umrechnung des Spannungswerts auf die Fokauslenkung (siehe Unterkap. B).



**Abb. 8.7: Kalibrationsmessung zur Fokusposition**

Gezeigt ist eine Durchlichtaufnahme mehrerer Ablationsfoki in einem Deckglas mit einem Abstand von jeweils 100 Pixeln bzw.  $5,62\mu\text{m}$ . Hierbei wurde im Programm ein entsprechendes Muster mit fixen Schrittweiten von  $180,42\text{mV}$  vorgegeben. Die Linsen wurden mittels des Wasserimmersionsobjektivs durch je einen Laserpuls bei voller Laserleistung erstellt. Die eingezeichnete Längenskala beträgt  $10\mu\text{m}$ .

Eine simple erste Anwendung ergibt sich so z.B. in dem Einschreiben von Informationen in das Deckglas. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 8.8 gezeigt. Weitere Details zur Durchführung von Ablationsexperimenten sowie der Einsatz in biologischen Systemen finden sich in Unterkap. 9.3.



**Abb. 8.8: Ablationsbeispiel**

Gezeigt ist eine Durchlichtaufnahme einer in einem Deckglas eingebrannten, maßstabsgetreuen Längenskala mit dem Schriftzug „ $10\mu\text{m}$ “. Hierfür wurden über das Kontrollprogramm entsprechende Ablationsmuster bestehend aus mehreren Mikrolinsen mit einem Abstand von jeweils  $281\text{nm}$  durch je einen Puls mittels des Wasserimmersionsobjektivs erstellt. Leichte Defekte bei zu nahe benachbarten Linien der Schrift entstehen durch Risse im Glas.

## 9. Anwendungen

*Dieses Kapitel beinhaltet den Einsatz des zuvor behandelten SD-FRAP-Ablations-Aufbau und zeigt die Implementierung der experimentellen Techniken in Form exemplarischer „Proof-of-Principle“-Messungen. Es werden Beispiele höchstauflösender Bildaufnahmen mittels ISM, FRAP-Messungen sowie Ablationsexperimente in fixierten und lebenden Kulturzellen sowie in frühen Wumembryonen vorgestellt. Die einzelnen Unterkapitel beschreiben die hierfür notwendigen Details zur Versuchsdurchführung und Datenverarbeitung und geben jeweils einen Ausblick auf zukünftige Projekte, die durch die vorgestellten Techniken ermöglicht werden.*

*Implementierung, Probenpräparation, Versuchsdurchführung und Datenevaluation wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Die in Unterkap. 9.1 verwendeten fixierten Zellproben wurden von Herrn Lorenz Stadler und Herrn Konstantin Speckner zur Verfügung gestellt. Die in Unterkap. 9.2 verwendeten fixierten und lebenden Zellproben wurden von Herrn Lorenz Stadler zur Verfügung gestellt.*

## 9.1. ISM-Aufnahmen

### Zielsetzung und Motivation

Techniken zur Auflösungssteigerung an klassischen lichtmikroskopischen Aufbauten benötigen häufig eine spezielle Ausstattung der Gerätschaften, so z.B. bei STED [173] (*stimulated emission depletion*), wo über eine örtlich begrenzte stimulierte Emission von Fluorophoren am Rande des Anregungsvolumen größere Auflösungen der Aufnahmen erreicht werden. Hier bedingt zudem die notwendige Implementierung an einem CLSM eine zeitaufwändige Abrasterung der Probe. Andere Methoden der höchstaufösenden Mikroskopie, wie z.B. PALM [174] (*photo-activated localization microscopy*) oder STORM [175] (*stochastic optical reconstruction microscopy*) stellen besondere Anforderungen an die verwendeten Proben, indem sie die Positionen einzelner photoaktivierbarer oder stochastisch blinkender Moleküle über mehrere Aufnahmen hinweg bestimmen. Neben den Probenanforderungen werden hier jedoch auch insbesondere lange Aufnahmenreihen benötigt, um eine abschließend aus den einzelnen Lokalisierungen ermittelte Aufnahme rekonstruieren zu können. Eine simplere Technik zur Auflösungssteigerung stellt die in Unterkap. 3.1.7 vorgestellte Methode der *Image scanning microscopy* dar, bei der über die Verwendung eines Kamerasensors die Abbildung des *Pinholes* verwendet werden kann, um eine verbesserte Auflösung der rekonstruierten Gesamtaufnahme zu erstellen. Hierzu werden für eine Implementierung an einem Spinning-Disk-Mikroskop nach [86] neben der Spinning-Disk-Einheit und einer Kamera nur eine Realisierung der stroboskopartigen Beleuchtung benötigt, ohne besondere weitere Anforderungen an die verwendeten Proben. Dies ermöglicht den Einsatz dieser Technik an einer weiten Bandbreite an Proben und Fragestellungen.

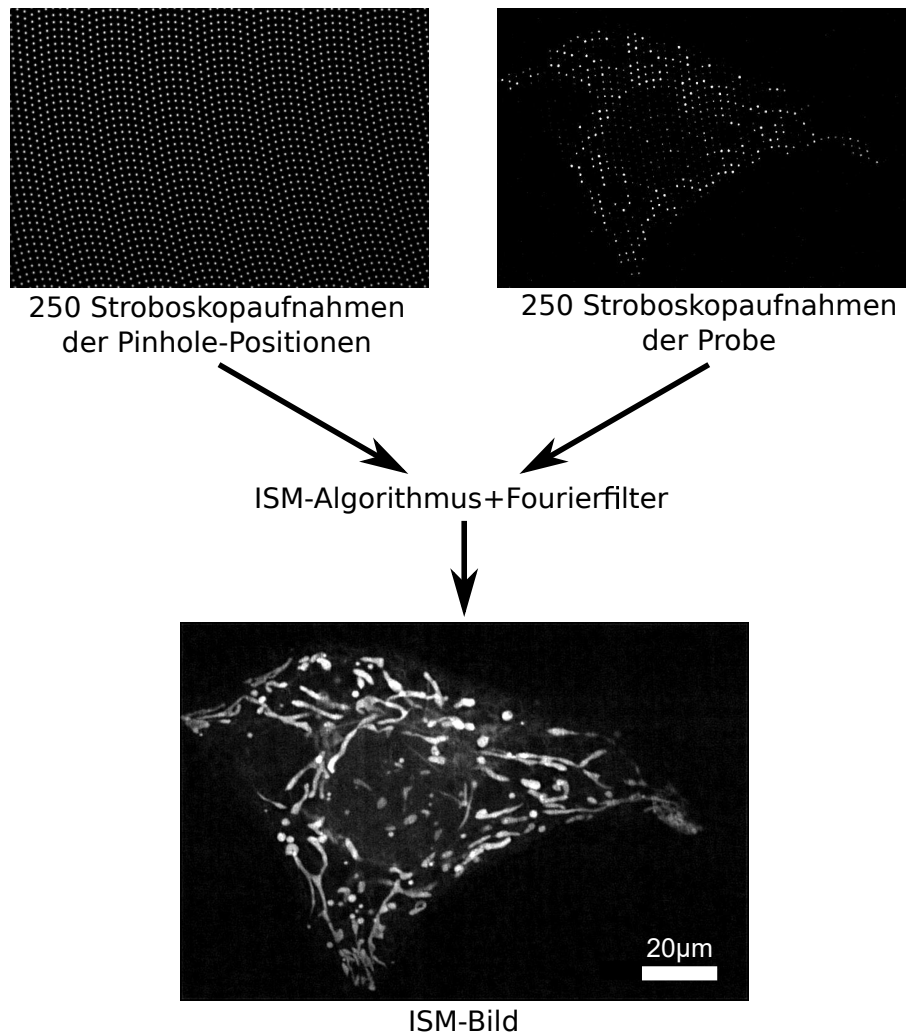
Ein Ziel im Rahmen dieser Arbeit ist die Implementierung von ISM-Aufnahmen an dem in Unterkap. 8 vorgestelltem SD-FRAP-Ablations-Aufbau. Die hierbei erwartete laterale Auflösungssteigerung um einen Faktor  $1,24 - 1,55$  [86] soll für zukünftige und laufende Projekte am Lehrstuhl bezüglich der Untersuchung von Netzwerkstrukturen in lebenden Organismen und insbesondere bei der Quantifizierung ihrer Topologien entsprechende Verbesserungen bringen. Die Vorteile bei der Implementierung dieser Methode an einem Spinning-Disk-Aufbau finden sich insbesondere in der reduzierten Aufnahmedauer und Strahlenbelastung und der daraus resultierenden geringeren Phototoxizität und Bleichrate.

### Realisierung am Aufbau und Ablauf der Datenaufnahme

Zur Erstellung höchstaufgelöster konfokaler Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen wurde am Aufbau die Methode des *confocal spinning-disk image scanning microscopy*-Verfahrens (**CSD-ISM**) nach [86] implementiert. Hierfür sind nachfolgende Kriterien am Aufbau zu erfüllen:

- Möglichkeit einer Spinning-Disk-Aufnahme über ein Fluoreszenzmikroskop mit einer Laserquelle zur Anregung
- Möglichkeit der getriggerten Shutterung des Anregungslasers bzgl. der Scheibenposition der Spinning-Disk im  $\mu\text{s}$ -Bereich
- Synchronisation der Kameraaufnahme und Laserpulse mit der Position der Nipkow-Scheiben der Spinning-Disk-Einheit

Die Shutter-Funktion im Aufbau wird hierbei durch den verbauten AOTF realisiert während die zeitkritische Synchronisierung zwischen der SD-Einheit und dem AOTF über den FPGA der Multifunktions-RIO-Karte erfolgt (siehe Unterkap. 8). Durch das Öffnen des Shutters für ein Zeitintervall im  $\mu\text{s}$ -Bereich bei geringen Umdrehungsgeschwindigkeiten der Nipkow-Scheiben

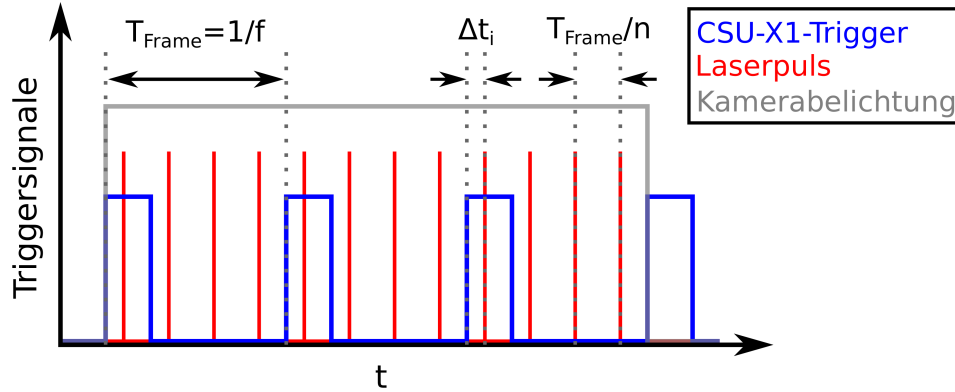


**Abb. 9.1: Erstellung einer ISM-Aufnahme**

Die Erstellung einer ISM-Aufnahme erfolgt zunächst durch die Aufnahme der *Pinhole*-Positionen der Nipkow-Scheibe an einer homogenen Probe zu den gegebenen Zeitpunkten der Stroboskopaufnahmen. Diese werden mithilfe der *rapidSTORM*-Software zur Bestimmung der einzelnen Referenzpositionen verwendet. Aus den Einzelaufnahmen der eigentlichen Probe unter der Stroboskopbeleuchtung wird daraufhin innerhalb der *ImageJ*-Software mittels der zuvor bestimmten *Pinhole*-Positionen das ISM-Bild erzeugt und über einen weiteren optionalen Fourierfilter die volle Auflösungssteigerung erreicht. Bei der gezeigten Probe handelt es sich um eine HeLa-Zelle mit einer Fluoreszenzmarkierung des mitochondrialen Netzwerkes.

Ist es so möglich, eine Momentaufnahme der Fluoreszenz an den *Pinhole*-Positionen der Nipkow-Scheiben aufzunehmen, ohne dass die kontinuierliche Bewegung der *Pinhole*-Positionen merkbare Artefakte generiert. Abb. 9.1 zeigt das Prinzip einer solchen Aufnahme mit Beispielen der *Pinhole*-Verteilung für eine einzelne Stroboskopaufnahme für eine homogene Probe des bereits zuvor verwendeten *Chromaslide* sowie eine Stroboskopaufnahme einer fixierten HeLa-Zelle (menschliche Gebärmutterhalskrebszellen) mit einer Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien. Im unteren Teil der Abbildung ist das Ergebnis der Bildrekonstruktion der Zellaufnahmen nach der ISM-Methode dargestellt. Die Abbildungen der einzelnen *Pinholes* mit einer realen Breite von 50µm besitzen eine über einen Gauß-Fit ermittelte Breite von  $\sigma_{\text{Pinhole}} = (287 \pm 3)\text{nm}$  in der Bildebene mit einem Abstand von minimal  $(1349 \pm 56)\text{nm}$  zu den Mittelpunkten der nächst

gelegenen *Pinholes*. Durch eine iterative zeitliche Verschiebung der Shutter-Öffnungsereignisse bezüglich der Positionen der Nipkow-Scheiben zwischen den Einzelaufnahmen erfolgt eine Abtastung der gesamten Probe. Eine wiederholte Anregung der gleichen *Pinhole*-Verteilung innerhalb einer Kameraaufnahme kann zudem das Signal-Rausch-Verhältnis der Einzelaufnahmen auf Kosten einer längeren Aufnahmedauer bei Bedarf verbessern.



**Abb. 9.2: Beispiel der Steuersignalsequenz einer ISM-Aufnahme**

Innerhalb einer ISM-Aufnahme wird zunächst das Triggersignal der CSU-X1-Einheit (blau), welches die Position der Nipkow-Scheibe nach jeweils einem Zwölftel einer vollen Umdrehung bzw. dem vollständigem Abtasten der Bildebene anzeigt, über die FPGA-Einheit ausgelesen. Ist die Kamera zur Aufnahme eines Frames bereit, wird bei dem nächsten Triggersignal der CSU-X1-Einheit die Kameraaufnahme über ein entsprechendes Triggersignal der FPGA-Einheit an die Kamera gestartet. Nach einer Zeitverschiebung  $\Delta t_i = \frac{(i-1)}{N \cdot n \cdot f}$ , entsprechend des Index  $i$  der Aufnahme wird ein Laserpuls zur Probenbeleuchtung über ein endliches Triggersignal der FPGA-Einheit (in dieser Arbeit  $4\mu\text{s}$ ) an den AOTF gesendet und für eine verwendete Pulsanzahl von  $n = 4$  drei weitere Male mit einer zeitlichen Verschiebung entsprechend  $T_{\text{Frame}}/4$  wiederholt, wodurch die entstehende Einzelaufnahme eine Anregung und Detektion nicht überlappender *Pinhole*-Positionen zur Folge hat. Zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses kann dies über eine erhöhte Anzahl an Iterationen  $I$  während der Aufnahme wiederholt werden (im gezeigten Beispiel mit  $I = 3$ ). Hier nicht gezeigt ist eine zusätzlicher Sicherheitsabstand von  $T_{\text{Frame}} = 2\text{ms}$  zwischen diesen Iterationen, um eine korrekte Pulsgebung durch das Auslesen der CSU-X1-Triggersignale zu gewährleisten. Nach der entsprechenden Anzahl an Iterationen der Pulsfolgen endet die Kamerabelichtung der Einzelaufnahme. Die Kamera wird innerhalb der Auslesezeit  $t_{\text{Readout}}$  ausgelesen und die nachfolgende Aufnahme einer nun verschobenen *Pinhole*-Verteilung mit einem entsprechend erhöhten Index  $i$  und größerem Zeitabstand  $\Delta t_i$  kann aufgenommen werden. Nach 250 Einzelaufnahmen wird so die komplette Bildebene über die aufgenommenen *Pinhole*-Verteilungen aufgenommen.

Die zur Erstellung einer ISM-Aufnahme notwendige Synchronisation ist in Form der hierfür am Aufbau notwendigen Triggersignale in Abb. 9.2 beispielhaft für eine einzelne Stroboskopaufnahme gezeigt. Bei einer vollständigen Umdrehung der Nipkow-Scheiben wiederholt sich das Muster der *Pinhole*-Positionen 12 mal. Bei einer gewählten Umdrehungsgeschwindigkeit von 2500rpm (*rounds per minute*) erfolgt die komplette Abtastung des Bildausschnitts also mit einer Frequenz von  $f = 12 \cdot 2500/60\text{s} = 500\frac{1}{\text{s}}$  innerhalb eines Zeitraums von  $T_{\text{Frame}} = 1/f = 2\text{ms}$ . Bei dieser Geschwindigkeit führen Laserpuls-Dauern von  $4\mu\text{s}$  zu keiner erkennbaren Elongation der *Pinhole*-Form auf dem Detektor (zum Vergleich wurde dies auch für 1500rpm und Pulsdauern unterhalb von  $8\mu\text{s}$  berichtet [86]). Eine Bildrekonstruktion aus 1000 Einzelaufnahmen führt so zu einem zeitlichen Versatz der Shutter-Öffnungsereignisse zwischen den Einzelaufnahmen von

$\Delta t = 1/(f \cdot 1000) = 2\mu\text{s}$  mit einer minimalen Gesamt-Messdauer von  $T_{\min} = 1000/f = 2\text{s}$ . Dies berücksichtigt jedoch noch keine Integration über mehrere Pulse zur Signalsteigerung oder Wartezeiten für das Auslesen des Kamerasensors zwischen den einzelnen Aufnahmen. Die Messdauer und Anzahl an Einzelaufnahmen kann reduziert werden, indem mehrere Pulse zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer Einzelaufnahme getätigt werden. Dies ist möglich, solange alle so beleuchteten *Pinhole*-Positionen in der Probe auf dem Sensor der Kamera weit genug voneinander entfernt sind und keine Überlappungen aufweisen. Durch die Verwendung von  $n = 4$  Laserpuls-Ereignissen kann die Gesamtmessdauer und die Anzahl der Aufnahmen so um den entsprechenden Faktor  $n$  reduziert werden (siehe Abb. 9.2). Eine weitere Steigerung von  $n$  auf 8 oder 16 Pulse reduziert die Anzahl der nötigen Einzelaufnahmen, kann jedoch zu einem gewissen Überlapp der *Pinhole*-Positionen und zu möglichen Artefakten in den rekonstruierten Aufnahmen führen, was teilweise durch eine spätere Frequenzfilterung der Daten behoben werden kann [86]. Die Synchronisierung während der Datenaufnahme erfolgt über ein selbst erstelltes Messprogramm auf dem FPGA in folgender Weise:

1. innerhalb der *HoKaWo*-Software wird ein Stream mit der entsprechenden Anzahl  $N$  der Einzelaufnahmen vorbereitet
2. die Kameraaufnahme wird im *Level-Edge*-Trigger-Modus gestartet (der Sensor detektiert dabei ankommende Photonen nur über die Dauer eines Triggersignals am entsprechenden Eingang der Kamera)
3. der FPGA beginnt über ein TTL-Signal an die Kamera die Aufnahme
4. der FPGA wartet auf das Triggersignal der SD-Einheit zu Beginn einer neuen Umdrehung
5. je nach Index  $i$  der Einzelaufnahme wird eine zusätzliche Zeitverschiebung  $\Delta t_i = \frac{(i-1)}{N \cdot n \cdot f}$  mit  $i = [1, N]$  gewartet
6. der FPGA legt für die gewünschte Laserpuls-Dauer  $t_{\text{Puls}}$  ein entsprechendes Spannungssignal an den AOTF, was zur kurzzeitigen Beleuchtung der Probe führt
7. die Beleuchtung wird daraufhin  $n - 1$  mal wiederholt, mit einem Zeitversatz von jeweils  $\Delta t' = \frac{1}{f \cdot n}$  zwischen den Anfängen der einzelnen Pulse
8. entsprechend der eingestellten Pulsintegrationszahl  $I$  einer Einzelaufnahme wird die in den Schritten 6-7 ausgeführte Probenbeleuchtung  $(I - 1)$  mal wiederholt
9. die Aufnahme wird über das TTL-Signal des FPGA an die Kamera beendet und innerhalb einer Aufnahme-Auslesezeit  $t_{\text{Readout}}$  ausgelesen und gespeichert
10. die Schritte 1-9 werden  $N - 1$  mal wiederholt, bis alle Einzelaufnahmen getätigt wurden und der Kamera-Stream beendet ist

Typische Parameterwerte, die verwendet wurden, sind:

- Laserleistung (491nm / 561nm): 100mW
- AOTF (491nm / 561nm): 10V
- Binning (on-chip):  $1 \times 1-2 \times 2$
- ROI:  $(1024 \times 1024) - (2048 \times 2048)$  Pixel
- $f = 500 \frac{1}{\text{s}}$  / SD-Geschwindigkeit 2500rpm

- $t_{\text{Puls}} = 4\mu\text{s}$
- $n = 4$
- $N = 250$
- $I = 50$
- $t_{\text{Readout}} = 20\text{ms} (2048 \times 2048 \text{ Pixel}) - 5\text{ms} (512 \times 512 \text{ Pixel})$

hieraus ergeben sich demnach

- $\Delta t_i = (i - 1) \cdot 2\mu\text{s}$  und  $\Delta t' = 500\mu\text{s}$

Eine Abbildung des erstellten Programms zur Durchführung von Stroboskopaufnahmen findet sich im Anhang dieser Arbeit in Abb. B.3. Zur späteren Berücksichtigung des Kamerahintergrundes wird zudem eine Aufnahme der Probe ohne Beleuchtung erstellt. Für die notwendige Kenntnis der *Pinhole*-Positionen in Bezug auf die einzelnen Aufnahmen erfolgt eine Referenzmessung nach der oben beschriebenen Weise an einer homogen emittierenden Probe. Hierfür wird bei angepasster Laserintensität und den zuvor bei der Probenaufnahme verwendeten Parametern ein *Chromaslide* verwendet.

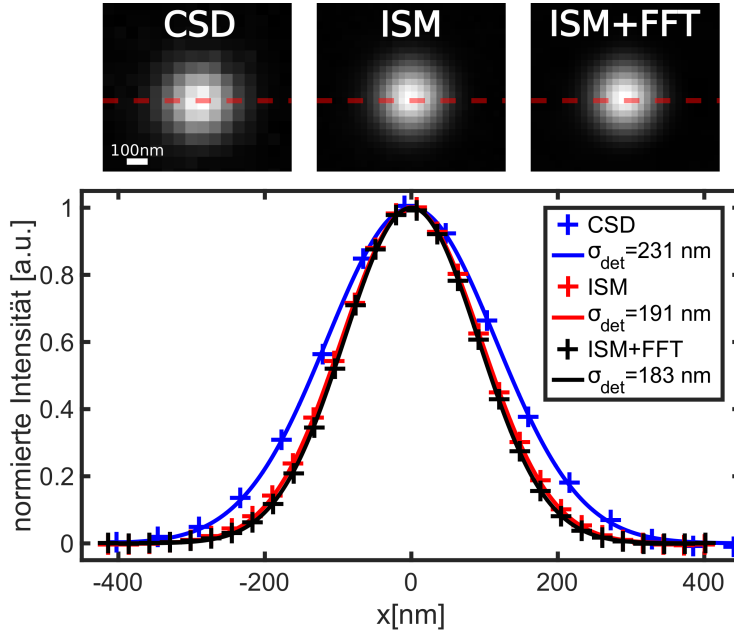
### Datenauswertung

Zur ISM-Bildrekonstruktion nach Kap. 3.1.7 werden zunächst die *Pinhole*-Positionen aus der Chromaslide-Aufnahme mittels der Software *rapidSTORM* [176] (V. 3.2) bestimmt und als .txt-Datei abgespeichert. Nach diesem Schritt kann die aus den Einzelaufnahmen der eigentlichen Messung bestehende Bilderreihe in *ImageJ* geladen, der Hintergrund abgezogen und über das *CSD-ISM-ImageJ* Plugin [86] die entsprechende Bild-Rekonstruktion durchgeführt werden. Hierbei werden die Bilddimensionen zwischenzeitlich um den Faktor 10 artifiziell vergrößert, um die mit Sub-Pixel-Genauigkeit bestimmten Zentren der *Pinholes* verrechnen zu können. Innerhalb eines Bereichs um die einzelnen *Pinhole*-Positionen, der dreimal so groß ist wie die Halbwertsbreite eines Gauß-Fits an den *Pinhole*-Referenzdaten, werden die einzelnen Pixeldaten nun jeweils um ihren halben Abstand bezüglich der optischen Achse der *Pinhole*-Position zu dieser hin verschoben. Dies geschieht rechnerisch über eine Verdoppelung der Pixelanzahl im Bild und die entsprechende Zuweisung zu den neuen Pixelkoordinaten. Hierdurch sind die Pixelabstände im entstehenden ISM-Bild um den Faktor zwei reduziert auf einen Pixelabstand von  $a_{\text{ISM}} = 28,6 \pm 0,8\text{nm}$ . Nach der Summierung über alle so bearbeiteten Einzelaufnahmen wird das entstandene Bild wieder um den Faktor 10 verkleinert und optional die Fourier-Filterung durchgeführt.

### Aufnahme einzelner Beads

Um den potentiellen Auflösungsgewinn der ISM-Methode zu quantifizieren werden zunächst Aufnahmen an den bereits zuvor verwendeten Beads getätigt. Hierfür werden vergleichbar zu der Bestimmung der Auflösung in den Unterkapiteln 4.3 und 8.3 eine verdünnte Lösung von fluoreszenzmarkierten Beads in einer Lösung aus 1% Agarose verwendet. In einer fixen Höhe werden nach dem obig beschriebenen Verfahren Stroboskopaufnahmen an der Probe durchgeführt und die nach der ISM-Methode rekonstruierten Aufnahme mit (ISM+FFT) und ohne Fourierfilterung (ISM) erstellt. Zum Vergleich mit einer normalen konfokalen Spinning-Disk-Aufnahme (CSD) können die aufsummierten hintergrundkorrigierten Einzelaufnahmen verwendet werden. Ein Beispiel einer so erstellten Aufnahme eines Beads mit einem Durchmesser von 200nm ist in Abb. 9.3 für die drei unterschiedlichen Szenarien zusammen mit einem Querschnitt und zugehörigem Gauß-Fit gezeigt. Neben der durch die ISM-Methode erhöhten Pixelanzahl ist insbesondere eine Abnahme der Breite des Intensitätsprofils aufgrund der Auflösungssteigerung zu bemerken.





**Abb. 9.3: Beispiele einer Bead-Aufnahme**

Gezeigt sind Aufnahmen eines 200nm-Beads im Detektionsbereich  $\lambda_{\text{det}} = 500 - 550\text{nm}$  in Form der aufsummierten Einzelbilder der Stroboskopaufnahme (CSD), der nach der ISM-Methode rekonstruierte Aufnahme (ISM) sowie der ISM-Aufnahme nach Anwendung eines Fourierfilters (ISM+FFT). Darunter sind die Intensitätsprofile eines Linienprofils in den Aufnahmen (rote Linie in den Aufnahmen) mit einem zugehörigen Fit gemäß einer Gaußfunktion. Die so ermittelten Werte der lateralen Auflösung  $\sigma_{\text{det}}$  zeigen die in den ISM-Aufnahmen gesteigerten Auflösungen im Vergleich zu der klassischen konfokalen Spinning-Disk-Aufnahme.

Die aus diesen Intensitätsprofilen einzelner Beads ermittelten Werte der lateralen Auflösung  $\sigma_{xy}$  sind in Tab. 8 für unterschiedliche Detektionsbereiche gelistet. Die gemessenen Auflösungsverbesserungen  $I_{\text{ISM}} = \sigma_{xy}(\text{CSD})/\sigma_{xy}(\text{ISM})$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = \sigma_{xy}(\text{CSD})/\sigma_{xy}(\text{ISM+FFT})$  liegen mit Werten von  $I_{\text{ISM}} = 1,19$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = 1,26$  im Detektionsbereich  $\lambda_{\text{det}} = 500 - 550\text{nm}$  und  $I_{\text{ISM}} = 1,24$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = 1,32$  im Detektionsbereich  $\lambda_{\text{det}} = 575 - 625\text{nm}$  leicht unterhalb der berichteten Werte aus Messungen zur Auflösungsverbesserung an vergleichbaren

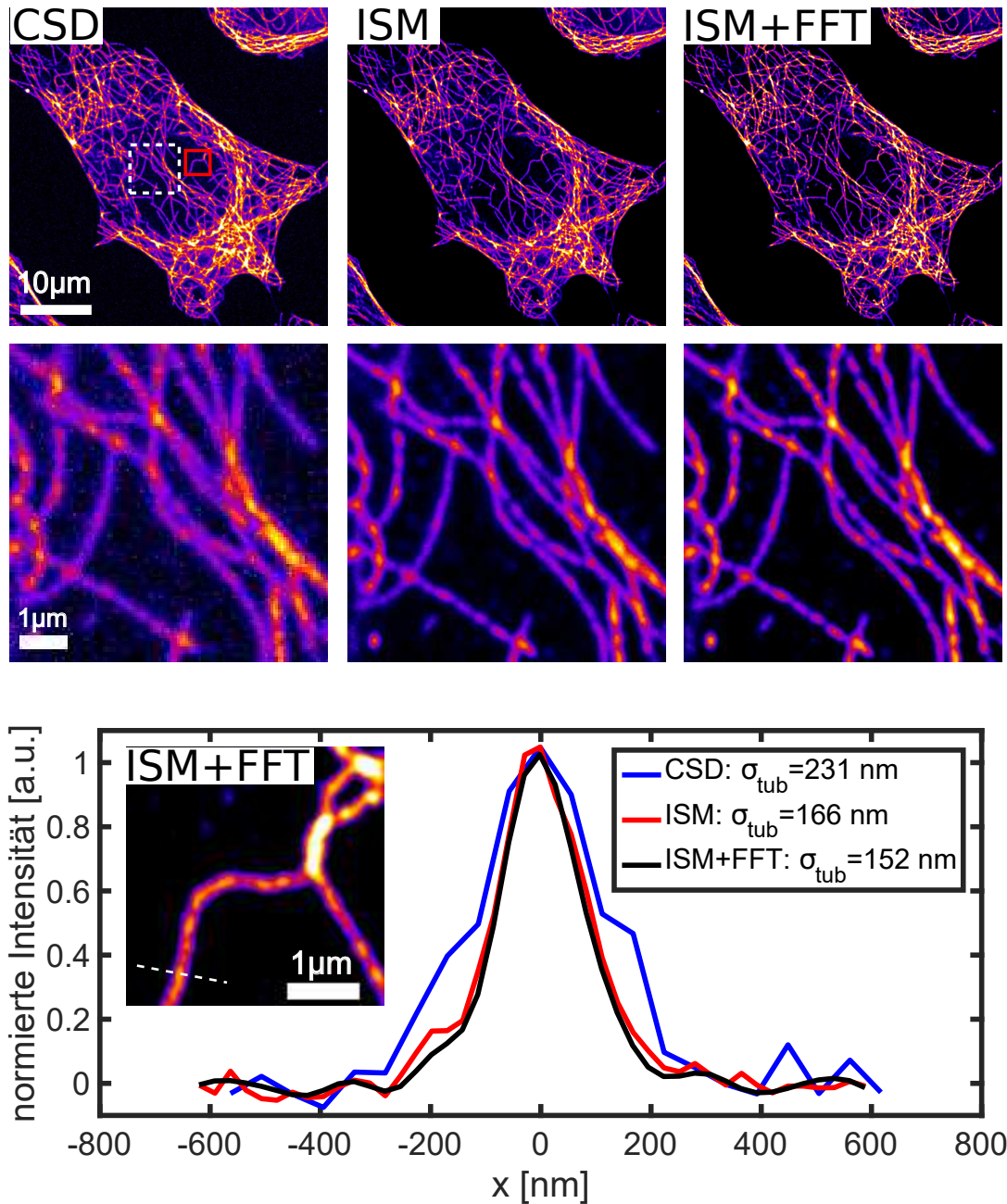
$\lambda_{\text{det}} = 500 - 550\text{nm}$		
CSD	ISM	ISM+FFT
$\sigma_{xy} = (235 \pm 6)\text{nm}$	$\sigma_{xy} = (197 \pm 3)\text{nm}$	$\sigma_{xy} = (186 \pm 4)\text{nm}$

$\lambda_{\text{det}} = 575 - 625\text{nm}$		
CSD	ISM	ISM+FFT
$\sigma_{xy} = (238 \pm 6)\text{nm}$	$\sigma_{xy} = (191 \pm 7)\text{nm}$	$\sigma_{xy} = (180 \pm 2)\text{nm}$

**Tab. 8: Werte der lateralen Auflösung für CSD- und ISM-Aufnahmen**

Gezeigt sind die aus Stroboskopaufnahmen ermittelten Werte der lateralen Auflösung einer CSD-Aufnahme, sowie die Werte aus den rekonstruierten ISM-Aufnahme mit und ohne Fourierfilterung. Die Auflösungsverbesserung liegt im Bereich 1,19 bzw. 1,26 für eine Detektion im Bereich 500 – 550nm und 1,24 bzw. 1,32 für 575 – 625nm. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Integration über 50 bzw. 500 4µs-Pulse für 500 – 550nm bzw. 575 – 625nm.



**Abb. 9.4: Vermessung der Mikrotubulidicke**

Aufnahmen einer fixierten HeLa-Zelle mit einer Färbung über *Alexa488* über einen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper zeigen das Netzwerk aus einzelnen Mikrotubuli über die gesamte Zelle. Der Zellkern in der Mitte der Zelle ist durch eine teilweise erhöhte Dichte von Mikrotubuli an seiner Peripherie zu erkennen. Ein vergrößerter Ausschnitt (weißer Kasten) zeigt die deutlich verbesserte Unterscheidbarkeit einzelner Mikrotubuli für nahe beieinanderliegende oder sich kreuzende Filamente. Ein normiertes Intensitätsprofil durch ein einzelnes Filament (weißer Strich) in der Mitte der Zelle (roter Kasten) zeigt die Steigerung der Auflösung der ISM-Aufnahmen mit und ohne Fourierfilter gegenüber den CSD-Aufnahmen. Ein Fit einer Gaußfunktion (nicht gezeigt) liefert abnehmende Werte des Querschnitts  $\sigma_{\text{tub}}$  (Abfall der Intensität auf  $1/e^2$ ) mit einem minimalen Wert von 152nm in der ISM-Aufnahme mit Fourierfilter. Der tatsächliche Querschnitt des Filaments liegt mit ca. 25nm weit unterhalb der Auflösungsgrenze [177].

Aufbauten ( $I_{\text{ISM}} = 1,24$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = 1,55$  für eine Detektion um 525nm und  $I_{\text{ISM}} = 1,33$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = 1,45$  für eine Detektion um 690nm [86]). Niedrigere Werte der Auflösungsverbesserung können zum einen in nicht berücksichtigten Aberrationen des optischen Systems begründet sein [85]. Des weiteren führt die endliche Abmessung der verwendeten Beads mit einem Durchmesser von 200nm zu einer effektiven Verbreiterung der experimentell gemessenen Auflösung des Systems. Messungen an Beads mit einem Durchmesser von 20nm führten zu vergleichbaren Werten der Auflösung bei einem stark reduzierten Signal-Rausch-Verhältnis der Intensitätsprofile aufgrund der niedrigeren Intensität in den Aufnahmen. Eine weitere Methode zur Abschätzung der Auflösungsgewinns folgt in der nachfolgenden Vermessung der Mikrotubulidicke, welche mit einer Dicke von ca. 25nm [177] weit unterhalb der Auflösungsgrenze liegt.

### **Vermessung der Mikrotubulidicke**

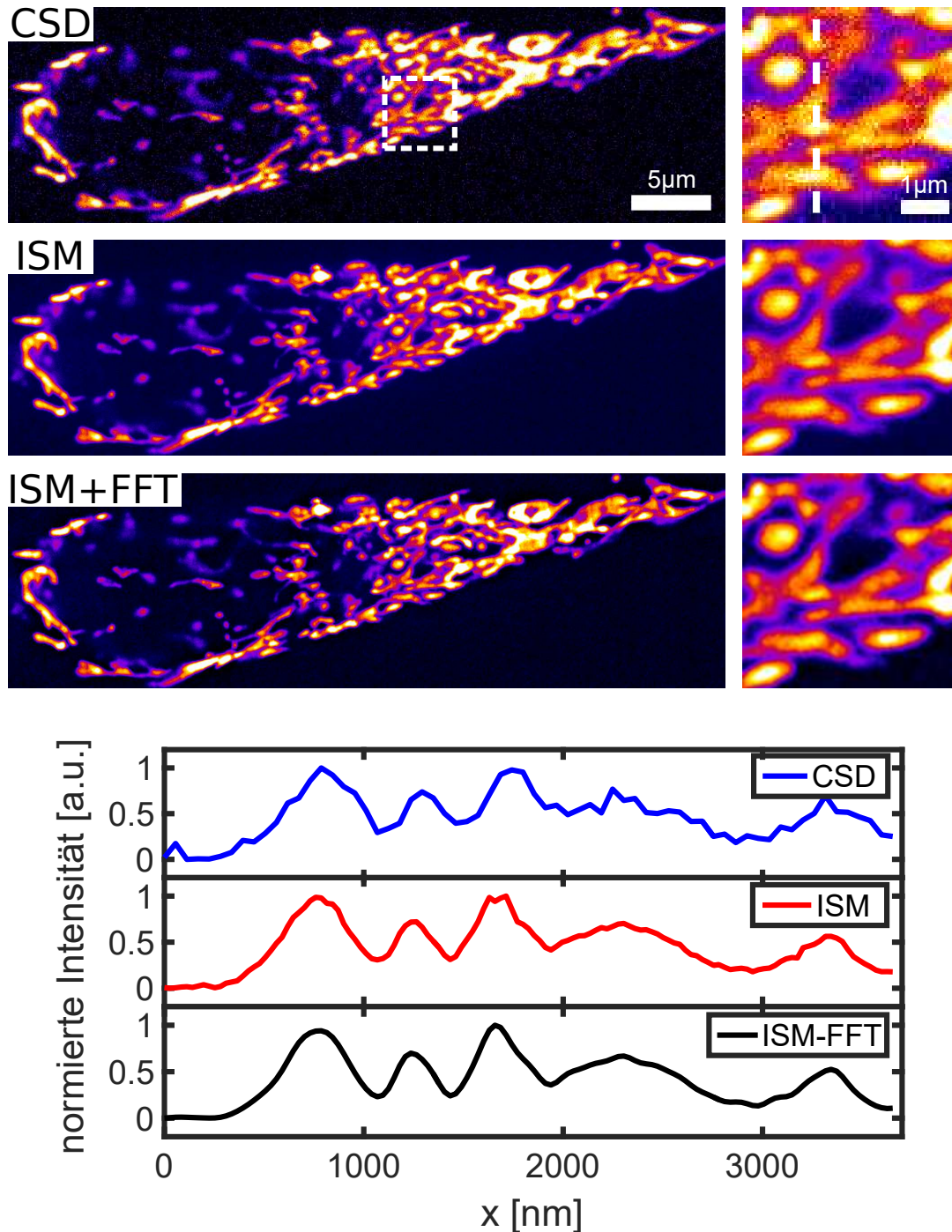
Eine erste Anwendung der ISM-Methode an biologischen Proben stellt die Aufnahme des Mikrotubulinetzwerkes in einer fixierten HeLa-Zelle dar. Hierfür wurden die Mikrotubuli mit einem  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper mit dem Farbstoff *Alexa488* eingefärbt und gemäß dem oben beschriebenen Protokoll Stroboskopaufnahmen durchgeführt. Das Ergebnis einer solchen Aufnahme ist in Abb. 9.4 für die drei Szenarien CSD, ISM und ISM+FFT mit einer Vergrößerung innerhalb der Abbildung und dem Intensitätsprofil eines Querschnitts durch ein Mikrotubulifilament gezeigt. Neben dem erhöhten Kontrast der ISM- und ISM+FFT-Aufnahme ist durch den Auflösungsgewinn eine deutlichere Separation der einzelnen Filamente und Filamentkreuzungen klar erkennbar. Die aus dem Fit einer Gaußfunktion ermittelten Werte der Filamentdurchmesser zeigen einen Auflösungsgewinn von  $I_{\text{ISM}} = 1,39$  bzw.  $I_{\text{ISM+FFT}} = 1,52$ , der oberhalb der Werte aus den zuvor gezeigten Messungen an Beads und in der Nähe der von anderen Gruppen berichteten Werte liegt [86]. Die gemessene Mikrotubulidicke ist mit einem Wert von 152nm der ISM+FFT-Aufnahme vergleichbar zu Werten anderer Gruppen aus Aufnahmen nach der ISM-Methode [88].

### **Aufnahme des mitochondrialen Netzwerkes**

Eine weitere potentielle Anwendung der ISM-Technik ist die Charakterisierung des mitochondrialen Netzwerkes in Kulturzellen. Die Mitochondrien bilden in der Zelle ein dynamisches tubuläres Netzwerk, welches sich auf einer Zeitskala von Minuten durch Fusions- und Fissionsereignisse einzelner Segmente anpasst [178, 179]. Das Netzwerk besteht hierbei aus teilweise verbunden zylindrischen Segmenten mit einem Durchmesser von mehreren 100nm und einem Bereich an Längen von bis zu 10 $\mu$ m. Die Untersuchung des mitochondrialen Netzwerkes wurde bereits in früheren Projekten am Lehrstuhl verfolgt, in denen die Netzwerktopologie anhand konfokaler Bildaufnahmen an fluoreszenzmarkierten Zellen aufgenommen und durch Bildverarbeitungsmethoden Parameter wie Segmentlängen und Knotenpunkte des Netzwerkes untersucht wurden [179]. Ein Beispiel einer ISM-Aufnahme einer über die Plasmid DNA mt-GFP transfizierten HeLa-Zelle ist in Abb. 9.5 gezeigt. Die Aufnahmen der summierten Stroboskopaufnahmen (CSD), sowie der ISM Aufnahmen mit und ohne Fourierfilter zeigen die Netzwerkstruktur der Mitochondrien im Zytoplasma der Zelle und den für die ISM-Aufnahmen erwarteten Anstieg der Auflösung und des Kontrastes der Aufnahme. Im Zusammenspiel mit der gesteigerten Auflösung von ISM-Aufnahmen und einer potentiell schnelleren Bildaufnahme durch das Spinning-Disk System liefert der in Kap. 8 vorgestellte Aufbau hierbei neue Möglichkeiten einer verlässlicheren Erfassung der Netzwerkparameter und der Untersuchung der Netzwerkdynamik.

### **Untersuchung des ER-Netzwerkes**

Neben dem mitochondrialen Netzwerk steht auch die Topologie des Netzwerkes des endoplasmatischen Retikulums im Fokus unterschiedlicher Projekte am Lehrstuhl [180, 181].



**Abb. 9.5: Beispiele einer ISM-Aufnahme am mitochondrialen Netzwerk**

Die über einen Antikörper mit GFP eingefärbten Mitochondrien in einer fixierten HeLa-Zelle zeigen ein ausgebildetes Netzwerk im Zytoplasma der Zelle. In einem vergrößerten Bereich (weißer Kasten) lassen sich insbesondere in den ISM-Aufnahmen einzelne Kreuzungen und Eindellungen erkennen. Die normierten Intensitätskurven entlang eines Querschnitts (weißer Strich) zeigt die in den ISM-Aufnahmen erhöhte Datenqualität.

Das verzweigte membranumschlossene Kanalsystem zeigt in seiner Struktur eine Koppelung an die Dynamik des Zytoskeletts der Zelle, was zu einer ständigen Umstrukturierung des ER-Netzwerkes in lebenden Zellen führt. Erste Untersuchungen dieser Dynamik, sowie eine Erfas-

sung der Netzwerktopologie wurden bereits am Lehrstuhl durch klassische konfokale Spinning-Disk-Aufnahmen an dem in Kap. 8 vorgestelltem Aufbau unternommen [181].

Abb. 9.6 zeigt eine exemplarische ISM-Aufnahme einer fixierten HeLa-Zelle mit einer Färbung des endoplasmatischen Retikulums durch eine Transfektion mit einer Plasmid-DNA des Proteins Calreticulin. In den unterschiedlichen Vergrößerungen des ER-Netzwerkes wird hierbei der Gewinn an Auflösung und Kontrast in den ISM-Aufnahmen gegenüber der CSD-Aufnahme deutlich.

### Aufnahmedauer einer ISM-Aufnahme

Aufgrund der konsekutiven Einzelaufnahme der *Pinhole*-Verteilungen muss für die Erstellung einer ISM-Aufnahme eine im Vergleich zur klassischen Spinning-Disk-Aufnahme verlängerte Aufnahmedauer in Kauf genommen werden. In der hier vorgestellten Realisierung ist die Limitierung der Zeitauflösung durch die zwei Größen der verwendeten Pulsintegrationszahl  $I$  und der Auslesezeit  $t_{\text{Readout}}$  vorgegeben. Die Gesamtdauer der Aufnahme ergibt sich zu

$$T_{\text{Aufnahme}} = 250 \cdot (I \cdot 4\text{ms} + t_{\text{Readout}}) \quad (9.1)$$

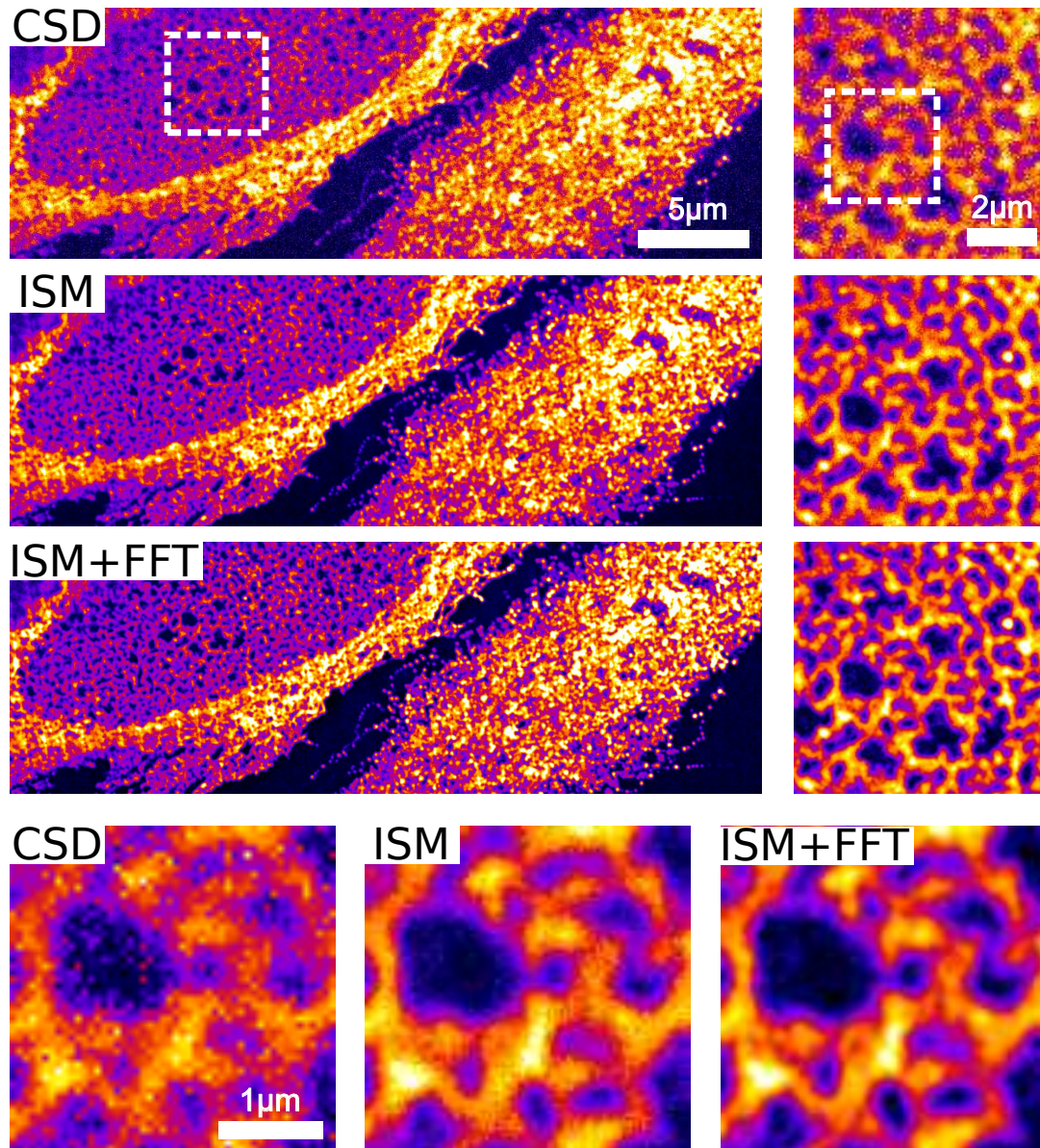
mit der entsprechenden Länge einer Einzelaufnahme von  $I \cdot 4\text{ms} + t_{\text{Readout}}$ . Der Zeitdauer von 4ms ergibt sich hierbei durch die SD-Geschwindigkeit von 2500rpm mit der Dauer von 2ms für das Abtasten des kompletten Bildausschnitts und einem derzeit implementierten zusätzlichen Sicherheitsabstand von 2ms für eine korrekte Pulsabgabe durch das iterative Auslesen des CSU-X1-Triggersignals. Für die hier gezeigten Aufnahmen mit  $I = 50$  und  $t_{\text{Readout}} = 10\text{ms}$  führt dies zu einer effektiven Aufnahmedauer von 52,5s. Hierbei sei angemerkt, dass die Anregung der Probe während der Aufnahmedauer nur einen geringen Bruchteil davon beträgt. Die Bestrahlungsdauer der Probe ergibt sich allein aus der Pulsanzahl  $n$ , der Pulsdauer  $t_{\text{Puls}}$  und der Pulsintegrationszahl  $I$  zu

$$T_{\text{Bestrahlung}} = 250 \cdot I \cdot n \cdot t_{\text{Puls}} = I \cdot 4\text{ms} \quad (9.2)$$

was für die hier gezeigten Aufnahmen zu einer Bestrahlungsdauer von nur 200ms, also 3,8% der Aufnahmedauer führt. Während die verwendete Größe der Pulsintegrationszahl  $I$  maßgeblich von der Signalstärke der Probe, der zur Verfügung stehenden Anregungsleistung des Lasers und dem gewünschtem Signal-Rausch-Verhältnis der Aufnahmen abhängt, ergibt sich die verwendete Auslesezeit  $t_{\text{Readout}}$  aus der benötigten Zeit der Kamera um die Aufnahme auszulesen bevor eine neue Aufnahme gestartet werden kann. Diese ist wiederum abhängig von der Größe der ausgewählten ROI und beträgt für den vollen Kamerasensor ( $2048 \times 2048$  Pixel) mindestens 20ms. Eine Reduktion auf einen Ausschnitt von  $512 \times 512$  Pixeln ermöglicht eine Erniedrigung von  $t_{\text{Readout}}$  auf 5ms.

Um die Aufnahmedauer für zukünftige Einsätze der ISM-Technik für die Untersuchung der Dynamik in lebenden Proben auf einen Bereich von maximal 1 – 10s zu erniedrigen, kann zum einen die Pulsanzahl während einer Aufnahme von 4 auf 8 Pulse gesteigert werden. Dies würde zu einer entsprechenden Reduzierung der nötigen Einzelaufnahmen auf  $N = 125$  führen, jedoch unter dem Risiko der Entstehung von Artefakten aufgrund eines zu geringen Abstandes der *Pinhole*-Verteilungen [86]. Ein Verzicht auf den Sicherheitsabstand eines Frames für mehrere Pulsiterationen würde weiterhin den Beitrag von  $I$  auf 2ms pro Pulsfolge herabsetzen. Für eine reduzierte ROI-Größe von  $512 \times 512$  Pixeln würde dies für eine realistische Anzahl an Pulsiterationen von  $I = 10 - 40$  zu einer Gesamtaufnahmedauer von 3,1 – 10,6s führen. Die Anzahl der benötigten Pulsiterationen selbst ließe sich dementsprechend auch durch eine höhere eingekoppelte Laserleistung reduzieren, indem z.B. der bislang installierte Strahlteiler vor der Fasereinkopplung (siehe Abb. 8.1) durch einen Klappspiegel ersetzt und die zur Verfügung stehende Leistung somit verdoppelt werden würde. Die somit niedrigst mögliche Zeitaufnahmedauer einer ISM-Messung würde für nur eine Pulsiteration dementsprechend bei 875ms liegen.





**Abb. 9.6: Beispiele einer ISM-Aufnahme am ER**

Gezeigt sind CSD, ISM und ISM+FFT-Aufnahmen einer fixierten HeLa-Zelle, deren Endoplasmatisches Retikulum über eine Fluoreszenzmarkierung des Proteins Calreticulin sichtbar gemacht wurde. Des weiteren sind je zwei Vergrößerungen einzelner Bildabschnitte (weiße Kästen) abgebildet. Das ER zeigt in der linken Zelle eine deutlich sichtbare Netzwerkstruktur, während die rechte Zelle einen wahrscheinlich durch die Fixierung bedingten Zerfall des ER-Netzwerks in einzelne Tropfen aufweist. Neben einem gesteigerten Kontrast der beiden ISM-Aufnahmen im Vergleich zur CSD-Aufnahme zeigt sich insbesondere in der höchsten Vergrößerung eine detaillierte Auflösung des ER-Netzwerkes, welche eine genauere Analyse der Topologie ermöglicht.

#### Ausblick

Die hier vorgestellten ersten Aufnahmen nach der ISM-Methode zeigen den durch die Methode gewonnenen Auflösungsgewinn am Aufbau, der sich in derselben Größenordnungen vergleichbarer Studien anderer Gruppen befindet. Im Zusammenhang mit einer sichtbaren Steigerung des Kontrastes ermöglicht dies eine wertvolle Bereicherung in laufenden und zukünftigen Projekten am Lehrstuhl zur Aufnahme und Charakterisierung von Netzwerkstrukturen in Zellen. Für die

Ermöglichung von Aufnahmen zur Untersuchung von Netzwerkdynamiken in lebenden Proben ist eine Weiterentwicklung der derzeitigen Implementierung hinsichtlich der Aufnahmedauer angeraten. Die hierfür vorgestellten Verbesserungsmöglichkeiten in der derzeitigen Aufnahme-Software umfassen größtenteils nur Änderungen des Ansteuerungsprogramms und können mittelfristig implementiert werden.

## 9.2. FRAP-Messungen

### Zielsetzung und Motivation

Der separate Anregungsstrahlengang des Aufbaus erlaubt neben der im vorherigen Unterkapitel behandelten strukturierten Beleuchtung auch die Einkoppelung einer separaten Anregungsweges mit einer gezielten Positionierung eines lokal definierten Anregungsfokus über das Galvospiegelpaar. Dies ermöglicht die Durchführung von Bleichexperimenten (siehe Unterkap. 3.2.4), in denen Bereiche beliebiger Geometrie gebleicht und eine mögliche Signalerholung durch Diffusion oder Bindung aufgenommen werden kann. Somit werden sowohl die Bestimmung der Bindungskinetik markierter Proteine an unterschiedlichen Zellorganellen als auch Diffusionsmessungen in lebenden Proben ermöglicht. Anwendungen von FRAP-Experimenten an *C. elegans* in früheren Studien beschäftigten sich dabei beispielsweise mit der Bestimmung asymmetrischer Diffusion und der Charakterisierung von Proteinanbindung im frühen Embryo [33, 36, 164, 182]. Die Möglichkeit zur Durchführung solcher Experimente stellt somit auch eine wertvolle Bereicherung für die in dieser Arbeit bereits vorgestellten Projekte dar. In diesem Unterkapitel sollen nun erste Beispiele für derartige Messungen an simplen Farbstofflösungen, Kulturzellen und Wurmembryonen gezeigt werden.

### Realisierung am Aufbau und Ablauf der Datenaufnahme

Vor der Durchführung von Bleichmessungen kann zunächst eine Kalibration der Fokuspunktposition für eine angelegte Spannung an das Galvospiegelpaar über die Verwendung eines *Chromalides* durchgeführt werden. Hierbei wird die Position des Fokus innerhalb der *HoKaWo*-Software markiert und die Pixelkoordinaten zusammen mit der Galvoposition innerhalb der Kontrollsoftware eingegeben (siehe Abschnitt B im Anhang), um eine spätere Auswahl der Fokusposition gemäß den gewünschten Pixelkoordinaten zu realisieren. Danach kann die eigentliche Probe in den Probentisch des Mikroskops eingelegt werden.

Zur Durchführung von Bleichexperimenten wird innerhalb der Kontrollsoftware der Aufnahmemodus „*FRAP*“ ausgewählt. Dieser erlaubt in der derzeitigen Implementierung keine Mehrkanal- oder z-Stack-Aufnahmen, um eine hohe Zeitauflösung der Messung sicherzustellen. Vor der Messung müssen die Anzahl der *pre*- und *post-bleach*-Aufnahmen sowie die hierfür genutzten Werte der Anregungsleistung und Detektionsfilter in der Software eingestellt werden. Bei der Wahl der *pre*- und *post-bleach*-Laserleistung ist insbesondere darauf zu achten, eine Anregungsleistung zu wählen, die niedrig genug ist, um Bleichvorgänge während dieser Messungen zu vermeiden. Hierbei dienen die *pre-bleach*-Aufnahmen auch zur Überprüfung einer gleichbleibenden Intensität bei geeigneter Parameterwahl. Die *post-bleach*-Phase muss lang genug gewählt werden, um die Erholung der Intensität in der gebleichten Region auf ein Plateau zu erfassen. Der Bleichvorgang selbst muss über die Angabe der entsprechenden Bleichleistung des AOTF-Filters, sowie der ROI-Geometrie und -Position in Form von mehreren Bleichfokuspositionen mit einer jeweiligen Wartezeit  $t_{\text{Bleach}}$  innerhalb der Software definiert werden. Um eine geschlossene Form zu bleichen, sollte der Abstand der Fokipositionen hierbei nicht größer als die zuvor bestimmte Fokusgröße von 633 – 665nm sein. Eine zu große ROI bzw. zu viele Fokuspositionen und zu lange Wartezeiten führen zu einer zu langen Dauer des Bleichvorganges, innerhalb derer bereits eine Erholung der gebleichten Region stattfindet, weshalb die Dauer des Bleichvorgangs so kurz wie möglich gehalten werden sollte [121]. Die Wahl der Kamerabelichtungszeit, ROI-Größe der Aufnahme und ein eventuelles Binning wird abhängig von der untersuchten Zeitskala der der Fluoreszenzerholung zugrundeliegenden Dynamik, der Probengröße in der Bildebene sowie von dem Signal-Rausch-Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensität der Probe gewählt. Hierbei sollte eine möglichst hohe Bildaufnahmerate und eine ausreichend hohe Pixelanzahl für eine entsprechend hohe zeitliche und räumliche Auflösung der Fluoreszenzerholung erreicht werden. Die für die in diesem Kapitel gezeigten Messungen verwendeten Aufnahmeparameter sind wie



folgt:

- Laserleistung (491nm / 561nm): je 100mW
- Kamerabelichtungszeit: 50 – 100ms
- Binning (on-chip):  $4 \times 4$
- ROI:  $(124 \times 124) - (248 \times 248)$  Pixel
- Spinning-Disk-Geschwindigkeit: 5000rpm
- AOTF-Filter (491nm ): *je nach Probe*
- Anzahl an Stacks (*pre-bleach* / *post-bleach*): 20 / 2000 – 10000
- Kanaleinstellungen (Anregung + Detektion): 491nm + 500 – 550nm
- Bleichleistung - AOTF-Filter (491nm): 10V
- $t_{\text{Bleach}}$ : 1 – 5ms
- Galvoschrittweite: 5 Pixel / 281nm
- weitere Galvo-Einstellungen (ROI-Position, Schrittzahl, Iterationen): *je nach Probe*

Weitere Details zu den einzelnen Parametern der Kontrollsoftware finden sich im Anhang in Abschnitt B. Im Anschluss wird innerhalb der *HoKaWo*-Software ein Stream der entsprechenden Einzelbildanzahl vorbereitet und die Messung im externen Kameratrigger-Modus *Edge* gestartet. Die Messung kann anschließend über die *LabVIEW*-Setup-Software begonnen werden. Nach Abschluss der Messung wird die aufgenommene Bilderreihe automatisch als *.HIS*-Format gespeichert und zur späteren Auswertung in *Fiji* in ein *Multipage-Tiff* oder eine serielle Bildersequenz im *.tif* Format konvertiert.

### Datenauswertung

Zur Auswertung der Bleichkurve wird die Messung als *Multipage-Tiff* in der Software *Fiji* eingeladen und die Intensitätskurve der ausgewählten Bleichregion über die Funktion *Plot Z-axis Profile* in Form einer *.csv*-Datei extrahiert. Diese zeitlichen Intensitätsverläufe können im Anschluss z.B. in *Matlab* zur weiteren Auswertung eingeladen werden. Eine zusätzliche Hintergrundaufnahme bei ausgeschalteter Beleuchtungsquelle und ansonsten unveränderten Aufnahmebindungen dient zur Bestimmung des Kamerahintergrundes und kann von der Erholungskurve abgezogen werden. Sollte es nicht möglich sein eine Bleichaufnahme ohne Bleichvorgänge während der *pre*- und *post-bleach*-Aufnahme zu messen, kann eine Normalisierung der Bleichkurve  $I_{\text{FRAP}}(t)$  gemäß

$$I_{\text{FRAP,korr}}(t) = \frac{I_{\text{gesamt,pre}}}{I_{\text{FRAP,pre}}} \frac{I_{\text{FRAP}}(t) - I_{\text{BG}}(t)}{I_{\text{gesamt}}(t) - I_{\text{BG}}(t)} \quad (9.3)$$

durchgeführt werden [183]. Hierbei wird neben der Korrektur der Hintergrundintensität  $I_{\text{BG}}(t)$  zum einen die gemittelte Intensität  $I_{\text{FRAP}}(t)$  innerhalb der Bleichregion durch die gemittelte Intensität  $I_{\text{gesamt}}(t)$  der gesamten fluoreszenzmarkierten Probe geteilt und zum anderen die Intensitätskurve bezüglich der gemittelten Intensitäten  $I_{\text{gesamt,pre}}$  und  $I_{\text{FRAP,pre}}$  der *pre-bleach*-Aufnahmen normalisiert.

Zur Auswertung der Datensätze wird je nach vermuteter Systematik der Fluoreszenzerholung ein entsprechendes Fit-Modell verwendet. Aufgrund der derzeitigen Begrenzung der Bleichgeometrien auf rechteckige Formen, kann im Falle einer diffusionslimitierten Erholung hierbei nicht die

in Unterkap. 3.2.4 vorgestellte Formel für eine kreisförmige ROI verwendet werden. Stattdessen wird eine empirisch ermittelte Formel nach Ellenberg [184] der Form

$$I_{\text{FRAP}}(t) = A + B \cdot \left( 1 - \sqrt{\frac{w^2}{w^2 + 4\pi Dt}} \right) \quad (9.4)$$

mit der Seitenlänge  $w$  der Bleichregion und mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  als Fitparameter verwendet. Eine exaktere Formel zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten für den Fall einer lateralen Diffusion mit einer rechteckigen Bleichregion und einem zusätzlichem Anteil der Erholung durch An- bzw. Entbindung besitzt die Form

$$I_{\text{FRAP}}(t) = A \cdot \left( 1 + f_b \cdot \frac{4e^{-k_{\text{off}}t}}{d_x d_y} \right) \psi_x(t) \psi_y(t) \quad (9.5)$$

mit einem Normalisierungsparameter  $A$ , dem Bleichanteil  $f_b$  einer Entbindungsrate  $k_{\text{off}}$  und den Abmessungen  $d_{x,y}$  der Bleichregion. Die Diffusionsbeiträge  $\psi_{x,y}(t)$  ergeben sich so zu

$$\psi_{x,y}(t) = \left[ \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \left( e^{-d_{x,y}^2/(4Dt)} - 1 \right) + \frac{d_{x,y}}{2} \text{erf} \left( \frac{d_{x,y}}{\sqrt{4Dt}} \right) \right] \quad (9.6)$$

für eine Bleichregion mit unendlich steilen Kanten [164]. Darüber hinaus ist auch die Berücksichtigung experimenteller Abweichungen der Form des Bleichprofils in obiger Formel möglich. Aufgrund der endlichen Breite des Bleichfokus sowie der Verbreiterung des Bleichprofils im Falle einer diffusionslimitierten Erholung innerhalb der endlichen Bleich- bzw. Aufnahmedauer [121] kann bei einer hinreichend hohen Zeitaufösung die Steigung der Kanten der Bleichregion so über einen Fit an den räumlichen Intensitätsprofile direkt nach den Bleichereignissen ermittelt und in obiger Formel berücksichtigt werden [164]. Eine Verwendung der Gl. 9.5 an Daten aus Diffusionsmessungen führte während dieser Arbeit konsistent zu Ergebnissen, die ca. eine Größenordnung niedriger als die Fit-Ergebnissen nach Gl. 9.4 und den theoretischen Erwartungen lagen, weshalb die Auswertung der hier vorgestellten Diffusionsmessungen unter Verwendung der Gl. 9.4 erfolgt.

Die Auswertungen von Datensätzen, die eine bindungslimitierte Erholung der Diffusion vermuten lassen, werden mit einem exponentiellen Fit nach Gl. 3.41 ausgewertet.

### Dauer des Bleichvorgangs und Totzeit

Zur korrekten Auswertung der Erholungskurve in Bleichmessungen ist die genaue Kenntnis der Zeitpunkte der *post-bleach*-Aufnahmen bezogen auf das Bleichereignis notwendig. Aufgrund der endlichen Dauer des Bleichprozesses und der Notwendigkeit der Aufbauansteuerung ergibt sich eine gewisse Totzeit  $\Delta t_{\text{FRAP}}$  zwischen dem Ende der *pre-bleach*- und dem Beginn der *post-bleach*-Aufnahmen. Der zeitliche Nullpunkt der Messung wird für die Datenauswertung hierbei gemäß  $t_{\text{Korr}} = t - \Delta t_{\text{FRAP}}/2$  auf die Mitte des Bleichvorgangs gelegt, um die endliche Dauer des Bleichvorgangs zu kompensieren [184]. Die Totzeit ergibt sich zu

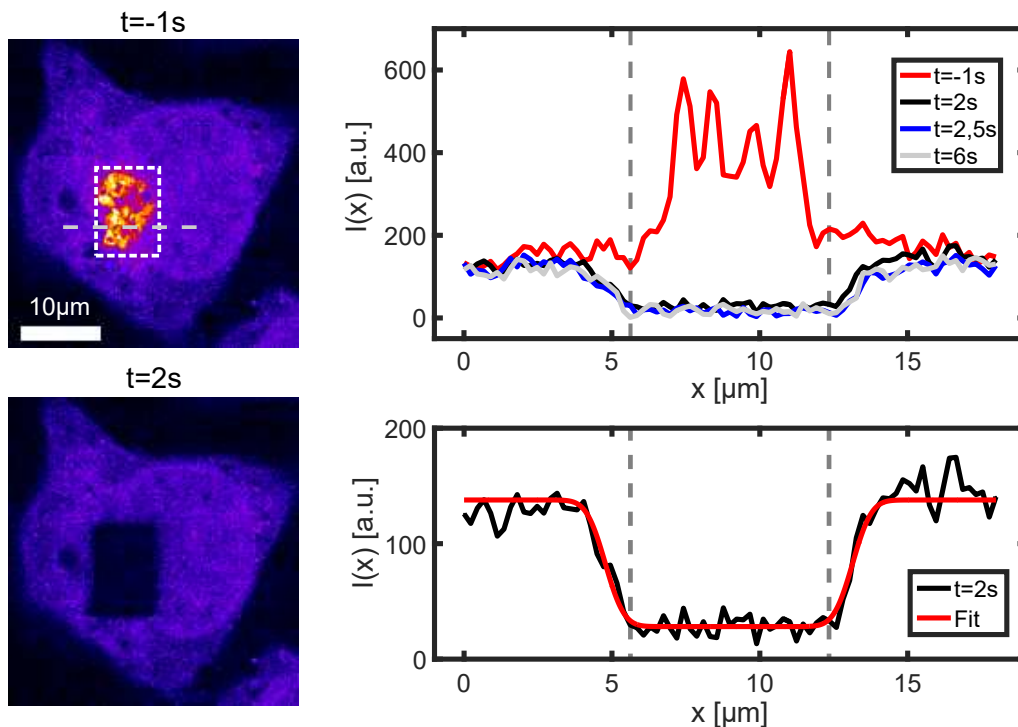
$$\Delta t_{\text{FRAP}} = N_{\text{Bleach}} \cdot (t_{\text{Bleach}} + t_{\text{Galvo}}) + 2 \cdot t_{\text{FW}} + t_{\text{Software}}$$

mit der Anzahl der Bleichfoki  $N_{\text{Bleach}}$ , der jeweiligen Bleichdauer  $t_{\text{Bleach}}$ , der Wartezeit für die Ansteuerung des Galvospiegelpaares  $t_{\text{Galvo}}$ , der Wartezeit zwischen dem Wechsel der Filterwürfel  $t_{\text{FW}}$  und einer softwareinternen Wartezeit  $t_{\text{Software}}$ , die sich aus der Architektur des Programmlaufs der Aufbaukontrollsoftware ergibt. Während der eigentliche Bleichvorgang mit einer Dauer von 5–50ms ( $N_{\text{Bleach}} = 100–1000$ ,  $t_{\text{Bleach}} = 1\text{ms}$ ,  $t_{\text{Galvo}} = 50\mu\text{s}$ ) zumeist unterhalb der

typischen Aufnahmedauer von 50ms bleibt, sind in der derzeitigen Implementierung insbesondere die Größen  $t_{FW} = 400\text{ms}$  und  $t_{\text{Software}} = 1235\text{ms}$  limitierend für den Zeitabstand zwischen Bleichereignis und *post-bleach*-Aufnahmen. Die Werte dieser Größen ergeben sich dabei zum einen aus der notwendigen Wartezeit für das mechanische Umklappen der Filterwürfelhalter im Mikroskopobjektiv und durch die notwendige serielle Kommunikation über den Kontroll-PC. Ein vorrangiges Ziel zukünftiger Verbesserungen am Aufbau ist daher die Reduzierung dieser Größen durch eine direkte Ansteuerung des Mikroskopstativs über Triggersignale des FPGA und ein möglicher vollständiger Verzicht auf die Notwendigkeit des Filterwürfelumklapps durch die Verwendung polarisationsabhängiger Dichroiten mit einer entsprechenden Polarisation der unterschiedlichen Strahlengänge.

### Messung der Bindungskinetik in Kulturzellen

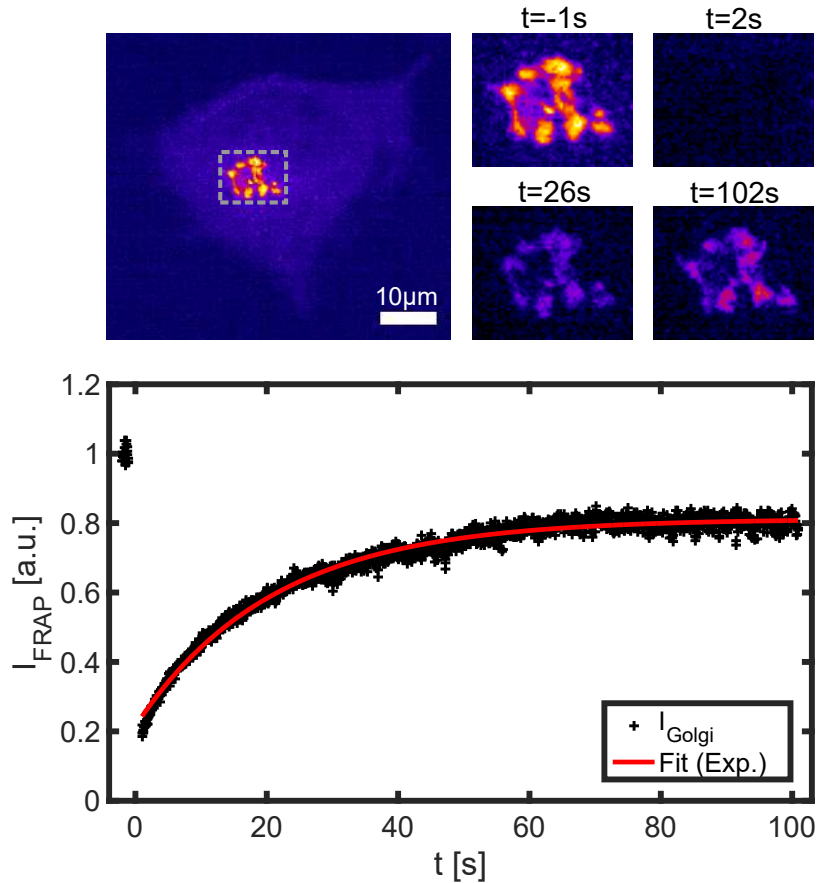
Um die Möglichkeiten des Aufbaus in Bleichexperimenten an biologischen Proben zu testen wird zunächst die Bleichung von einzelnen Organellen in Kulturzellen durchgeführt.



**Abb. 9.7: Bleichprofil in einer fixierten HeLa-Zelle**

Links gezeigt sind Aufnahmen einer fixierten HeLa-Zelle mit einer Fluoreszenzmarkierung des am Golgi-Apparat angelagerten Proteins Arf-1. Zum Zeitpunkt  $t = 0\text{s}$  wurde eine ROI der Größe  $(6,74 \times 10,12)\mu\text{m}^2$  (weißer Kasten) bei voller Laserleistung gebleicht. Im rechten oberen Teil der Abbildung sind Intensitätsprofile durch die gebleichte Region (graue gestrichelte Linie in linker Abbildung) für unterschiedliche Zeitpunkte der Aufnahme dargestellt. Die Fluoreszenz im Bereich der durch den Bleichstrahl abgetasteten Region, markiert durch zwei graue senkrechte Linien, zeigt das Ausbleichen der Fluorophore und das Ausbleiben einer Fluoreszenzerholung in der fixierten Zelle zu späteren Zeitpunkten. Die Steigung der Flanken der gebleichten Region zum ersten Zeitpunkt nach dem Bleichereignis lässt sich über einen Fit (rot) nach Gl. 9.7 beschreiben. Die durch den Fit ermittelte Steigung  $m = 1,4 \pm 0,4$  bleibt im Rahmen der Fehler für den weiteren Verlauf der Messung erhalten.

Zur Überprüfung des Bleichprofils wird eine fixierte HeLa-Zelle verwendet, in der das periphere Membranprotein Arf-1, welches in erhöhter Konzentration am Golgi-Apparat der Zelle vorzufinden ist, mittels GFP über eine transiente Transfektion fluoreszenzmarkiert wurde. Abb. 9.7 zeigt Aufnahmen einer solchen Zelle vor und nach der Bleichung einer rechteckigen ROI der Größe  $(6,7 \times 10,1)\mu\text{m}^2$  über  $24 \times 36$  Bleichfoki im Abstand von je 281nm mit  $t_{\text{Bleach}} = 1\text{ms}$  bei voller Laserleistung. Intensitätsprofile durch die gebleichte Region zeigen das nahezu vollständige Ausbleichen der dortigen Fluorophore und das erwartete Ausbleiben einer Fluoreszenzerholung durch Diffusion oder Bindung in der fixierten Zelle in den darauffolgenden Aufnahmen.



**Abb. 9.8: Messung der Bindungskinetik von Arf-1 am Golgi-Apparat**

Eine Bleichmessung am Golgi-Apparat einer lebenden HeLa-Zelle, in der das Protein Arf-1 mittels GFP fluoreszenzmarkiert wurde, zeigt die Erholung der Fluoreszenz über An- und Entbindung der Proteine zwischen Golgi-Apparat und Zytoplasma. Hierfür wird der Golgi-Apparat zum Zeitpunkt  $t = 0\text{s}$  über ein Rechteck der Größe  $(10 \times 7,6)\mu\text{m}^2$  gebleicht (grauer Kasten). In der Zeitaufnahme des Golgi-Apparates ist neben der zeitlichen Fluoreszenzerholung auch eine leichte Umstrukturierung der lebenden Zelle zu erkennen. Die nach Gl. 9.3 normierte Erholungskurve einer ROI um den Golgi-Apparat lässt sich über einen exponentiellen Fit nach Gl. 3.41 erfassen und liefert für die gezeigte Messung eine Zeitskala von  $\tau_B = (20,9 \pm 0,3)\text{s}$ . Dies ergibt unter Berücksichtigung der Fluoreszenzintensitäts- und Volumenverhältnisse eine Bindungskinetik mit  $k_{\text{on}} = (0,193 \pm 0,003)\text{s}^{-1}$  und  $k_{\text{off}} = (0,035 \pm 0,001)\text{s}^{-1}$ . Während der ersten Sekunden der *post-bleach*-Aufnahmen ist hierbei eine initiale Fluoreszenzerholung aufgrund von nicht zu vernachlässigender Diffusion zu erwarten, weshalb dieser Bereich vom exponentiellen Fit nicht erfasst wird.

Der Verlauf des Intensitätsprofils selbst lässt sich über eine Fehlerfunktionen gemäß

$$I_{\text{FRAP}}(x) = A \left[ 1 - B \left( \operatorname{erf} \left( m \left( \frac{d_x}{2} - x \right) \right) + \operatorname{erf} \left( m \left( \frac{d_x}{2} + x \right) \right) \right) \right] \quad (9.7)$$

mit der Steigung  $m$  und der Profilbreite  $d_x$  beschreiben [164]. Ein Fit an der Aufnahme direkt nach dem Bleichvorgang (siehe Abb. 9.7 rechts unten) liefert einen Wert der Steigung von  $m = 1,4 \pm 0,4$ , welcher im Rahmen der Fehler für die späteren Aufnahmen konstant bleibt ( $m = 1,7 \pm 0,5$  mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung).

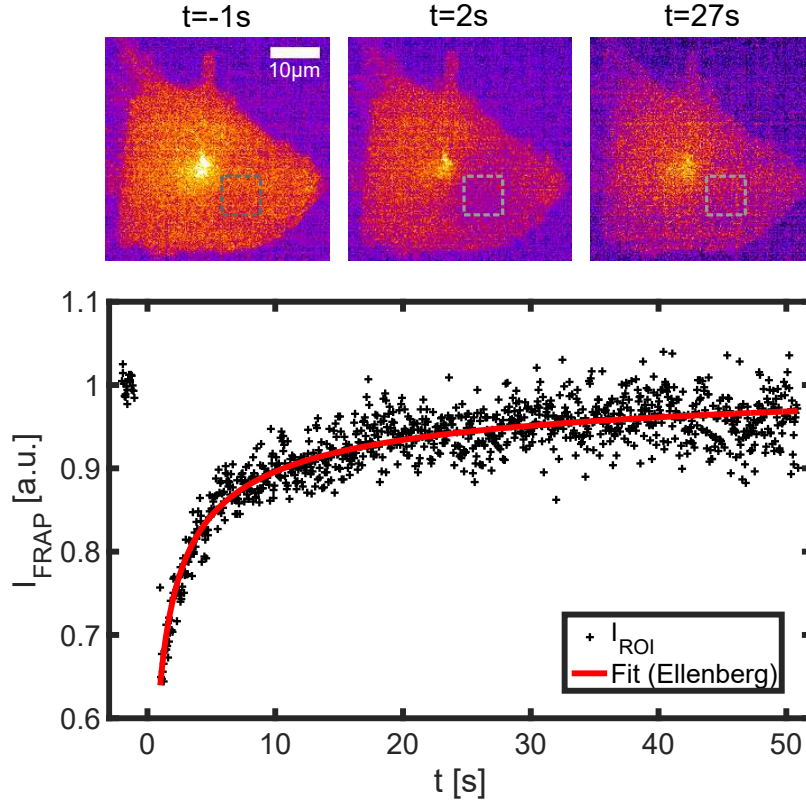
Zur Messung der Bindungskinetik des Proteins Arf-1 am Golgi-Apparat werden nun Bleichmessungen in lebenden Zellen durchgeführt. Diese werden hierfür in  $\mu$ -Slide 4 Wells der Firma ibidi (Martinsried, Deutschland) angesiedelt, transifiziert und 24 Stunden nach der Transfektion bei  $T = 37^\circ\text{C}$  gemessen. Abb. 9.8 zeigt eine exemplarische Aufnahme einer solchen Messung, in der die Proteine am Golgi-Apparat über eine ROI der Größe  $(10,1 \times 7,6) \mu\text{m}^2$  mittels  $36 \times 27$  Bleichfoki im Abstand von je 281nm mit  $t_{\text{Bleach}} = 1\text{ms}$  bei voller Laserleistung gebleicht werden. Die nach Gl. 9.3 normierte Erholungskurve der gemittelten Intensität in einer den Golgi-Apparat umschließenden ROI zeigt einen Abfall der Intensität auf 20% der *pre-bleach*-Intensität mit einer darauffolgenden Erholung der Fluoreszenz auf bis zu 80%. Die *post-bleach*-Aufnahmen zeigen hierbei kein sichtbares Bleichen während der Messung. Ein exponentieller Fit an die Erholungskurve nach Gl. 3.41 liefert eine Zeitskala der Erholung von  $\tau_B = (20,9 \pm 0,3)\text{s}$ . Eine Berücksichtigung des Größenverhältnisses zwischen Zellorganelle und Zytoplasma nach [124] liefert Werte der An- und Entbindungskoeffizienten von  $k_{\text{on}} = (0,193 \pm 0,003)\text{s}^{-1}$  und  $k_{\text{off}} = (0,035 \pm 0,001)\text{s}^{-1}$ . Messungen an insgesamt 5 Zellen ergeben vergleichbare Ergebnisse von  $k_{\text{on}} = (0,162 \pm 0,056)\text{s}^{-1}$  und  $k_{\text{off}} = (0,033 \pm 0,008)\text{s}^{-1}$  mit einem Fehler gemäß der Standardabweichung. Identische Messungen an CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) mittels eines kommerziellen konfokalen Mikroskops (Leica SP-5, Leica Microsystems) liefern vergleichbare Ergebnisse mit  $k_{\text{on}} = (0,21 \pm 0,01)\text{s}^{-1}$  und  $k_{\text{off}} = (0,057 \pm 0,03)\text{s}^{-1}$  [124].

### Abschätzung zytoplasmischer Diffusion in Kulturzellen

Neben der An- und Entbindung der Arf-1-Proteine an den Golgi-Apparat lässt sich in den lebenden Kulturzellen auch die Diffusion der Proteine im Zytoplasma der Zelle untersuchen. Aufgrund der oben beschriebenen Totzeit des Aufbaus nach bzw. während des Bleichvorgangs ist für die tendenziell schnellere Erholung durch Diffusion hier nur eine Abschätzung der korrekten Diffusionskoeffizienten zu erwarten. Zur Messung wird eine quadratische Region im Randbereich einer lebenden Zelle gebleicht, wobei in Durchlichtaufnahmen sichergestellt werden sollte, dass der Zellkern nicht in der Bleichregion liegt. Aufgrund der geringen Dicke der an den Plastikboden adhären den Zelllinie von  $1 - 2 \mu\text{m}$  kann der zytoplasmische Proteinanteil in axialer Dimension ausreichend tief gebleicht werden, um die Erholung der Fluoreszenz in der Bleichregion größtenteils auf laterale Diffusion zurückzuführen. Ein Beispiel einer solchen Messung für eine Bleichregion der Größe  $(7 \times 7) \mu\text{m}^2$ , bestehend aus  $25 \times 25$  Bleichfoki mit einem Abstand von je 281nm, ist in Abb. 9.9 gezeigt. Zusätzliche unerwünschte Bleichprozesse während der *post-bleach*-Aufnahmen werden durch die Normalisierung nach Gl. 9.3 kompensiert. Die normierte Erholungskurve lässt sich über einen Fit nach Gl. 9.4 beschreiben und liefert einen Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{Zyto}} = (23,5 \pm 2,7) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Messungen an insgesamt 5 unterschiedlichen Zellen liefern Werte der zytoplasmischen Diffusion zwischen  $3 - 24 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  mit einem Mittelwert von  $(11 \pm 8) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ .

Die Breite der Verteilung lässt sich hier teilweise auch auf einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Zellzyklenstadien zurückführen. FCS-Messungen an zytoplasmischen Arf-1 in früheren Studien [185] zeigten das Auftreten zweier Populationen bestehend aus Arf-1 im Monomerzustand (85%) mit einem Diffusionskoeffizienten von  $D = 15 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und einem geringeren Anteil

(15%) mit einem vermutlich aufgrund von Bindungen mit anderen Proteinen stark erniedrigtem Diffusionskoeffizienten von  $D = 0,5 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Obwohl das Signal-Rausch-Verhältnis der Erholungskurven eine sinnvolle zweikomponentige Auswertung nicht zulässt, kann die Größenordnung der Ergebnisse der einkomponentigen Auswertungen somit bestätigt werden.



**Abb. 9.9: Bleichmessung zytoplasmischer Diffusion**

Zur Messung der Diffusion von Proteinen im Zytoplasma lebender Zellen wird ein ROI der Größe  $(7 \times 7) \mu\text{m}^2$  (grauer Kasten) im Zytoplasma einer HeLa-Zelle gebleicht und der Verlauf der nach Gl. 9.3 normierten Erholungskurve betrachtet. Die diffusionslimitierte Erholung der Fluoreszenzintensität lässt sich durch einen Fit nach Gl. 9.4 (rot) erfassen und liefert einen Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{Zyto}} = (23,5 \pm 2,7) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ .

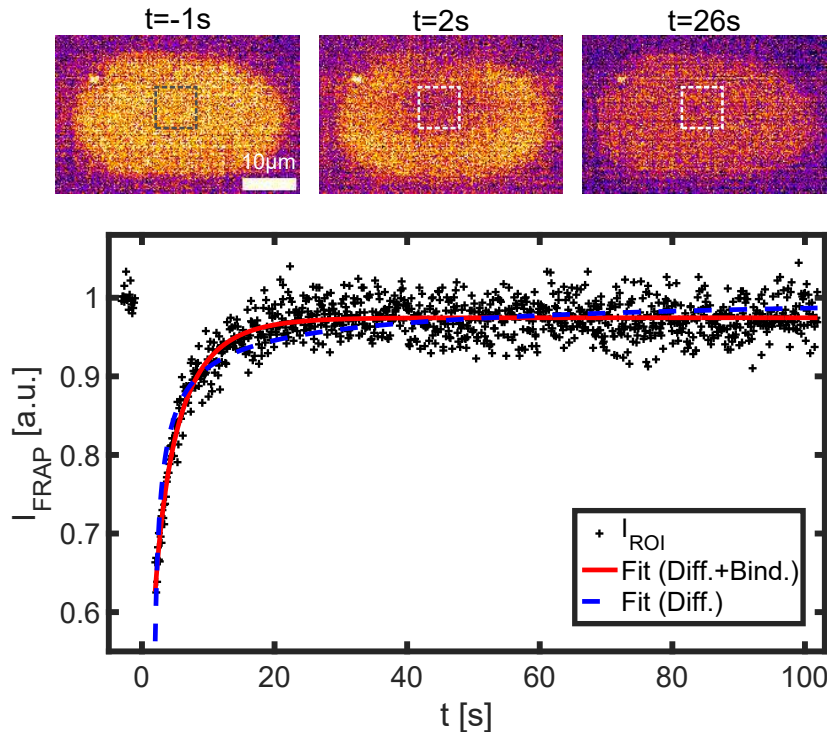
#### Abschätzung der Diffusion und Residenzzeit peripherer Membranproteine in Wurmembryonen

Zur Überprüfung der Einsatzmöglichkeiten des FRAP-Aufbaus in frühen Wurmembryonen wird nun versucht die Diffusion und Residenzzeit des bereits in Unterkap. 7.1 untersuchten peripheren Membranproteins PLC1 $\delta$ 1 durch Bleichmessungen zu ermitteln. Hierfür wird die bereits zuvor verwendete Wurmlinie **OD95** verwendet. Frühe Embryonen werden nach dem in Unterkap. 5.1 beschriebenen Protokoll entnommen und zur Messung im SD-FRAP-Ablations-Aufbau zwischen zwei Deckgläsern im Abstand von  $20 \mu\text{m}$  in einem Puffermedium präpariert. Eine genaue Beschreibung dieser Art von Probenpräparation erfolgt in Unterkap. 9.3. Durch die leichte Kompression des Embryos zwischen den Deckgläsern wird die Zellmembran zusätzlich leicht abgeflacht, was es ermöglicht, einen größeren Querschnitt durch diese in einer Bildebene aufzunehmen. Abb. 9.10 zeigt eine Bleichmessung an einem frühen Embryo zu einem Zeitpunkt ca. 3min vor der ersten Zellteilung. In einer Probenebene innerhalb der Zellmembran wird eine Region der Größe  $(7 \times 7) \mu\text{m}^2$ , bestehend aus  $25 \times 25$  Bleichfoki mit einem Abstand von je  $281 \text{nm}$ , bei voller Laserleistung gebleicht. Zusätzliches Bleichen während der *post-bleach*-Aufnahmen

wird durch die Normalisierung nach Gl. 9.3 kompensiert. Ein allein auf Diffusion basierender Fit nach Gl. 9.4 beschreibt die Erholungskurve der normierten mittleren Intensität der Bleichregion nur unzureichend und liefert einen Wert von  $D_{\text{Membran}} = (22,1 \pm 1,9) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Aufgrund der Ergebnisse aus Unterkap. 7.1 und früherer FRAP-Studien an PLC1 $\delta$ 1 [164] wird daher über einen zusätzlichen Beitrag  $e^{-t/T}$  die endliche Residenzzeit  $T$  des peripheren Membranproteins auf der Zellmembran berücksichtigt. Ein Fit der Form

$$I_{\text{FRAP}}(t) = A + B \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{T}} \cdot \sqrt{\frac{w^2}{w^2 + 4\pi Dt}} \right) \quad (9.8)$$

führt dementsprechend zu einer besseren Beschreibung der Datenpunkte und ergibt Werte von  $T = (6,8 \pm 1,2)\text{s}$  und  $D_{\text{Membran}} = (6,5 \pm 3,5) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Das Ergebnis der Residenzzeit ist vergleichbar mit der Abschätzung aus SPIM-FCS-Messungen in Unterkap. 7.1 mit  $T = 2,8\text{s}$  und FRAP-Messungen früherer Studien mit  $T = (8,3 \pm 1,1)\text{s}$  [164]. Das Ergebnis des Diffusionskoeffizienten liegt über den Werten der SPIM-FCS-Messungen ( $D = 0,63 - 1,04 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) und früherer FRAP-Studien ( $D = (1,7 \pm 0,2) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ) [164]. Diese Abweichung könnte in der bereits zuvor angesprochenen Problematik der zu langen Totzeit, einem möglichen Einfluss des zytoplasmischen Proteinanteils, sowie in der Korrektur des Aufnahmebleichens durch die Normalisierung nach Gl. 9.3 begründet sein.



**Abb. 9.10: Messung der Membrandiffusion und Bindungskinetik im frühen Embryo**

Gezeigt ist eine Bleichmessung einer Region der Größe  $(7 \times 7) \mu\text{m}^2$  (grauer Kasten) an der Zellmembran eines frühen *C. elegans*-Embryos der Linie **OD95** kurz vor der ersten Zellteilung. Hierbei ist das periphere Membranprotein PLC1 $\delta$ 1 mit dem Fluorophor GFP markiert. Die Erholungskurve der nach Gl. 9.3 normierten mittleren Intensität der Bleichregion wird durch einen allein auf Diffusion basierenden Fit nach Gl. 9.4 (blau) nur unzureichend erfasst. Eine angepasste Formel nach Gl. 9.8, die einen zusätzlichen Austausch des peripheren Membranproteins mit dem zytoplasmischen Proteinanteilen berücksichtigt, liefert Werte des Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{Membran}} = (6,5 \pm 3,5) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  und eine Residenzzeit von  $T = (6,8 \pm 1,2)\text{s}$ .

### Diskussion und Ausblick

Die hier gezeigten Messungen zeigen die Einsatzmöglichkeiten des Aufbaus zur Durchführung von Bleichexperimenten in lebenden Organismen. Die aufbaubedingte Totzeit aufgrund der endlichen Bleichdauer und der notwendigen Komponentensteuerung setzt hierbei insbesondere bei der Bestimmung einer schnellen, diffusionslimitierten Erholung in der derzeitigen Implementierung gewisse Grenzen bei den untersuchten Proben. Zukünftige Anpassungen an Steuerung und optischen Bauteilen ermöglichen hier Optimierungen. Die Quantifizierung der Bindungskinetik eines Proteins in lebenden Kulturzellen lieferte übereinstimmende Ergebnisse zu Messungen an einem kommerziellen Aufbau. Des weiteren ergab ein erster Einsatz in frühen Wurmembryonen vergleichbare Ergebnisse für die Residenzzeit eines peripheren Membranproteins auf der Zellmembran zu entsprechenden vorherigen Messungen in dieser Arbeit an einem anderen Aufbau und früheren Studien.

Durch die am Aufbau geschaffene Möglichkeit zur Messung von Diffusion und Bindungseignissen durch Bleichexperimente kann dies nun in nachfolgenden Projekten mit der hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung von Spinning-Disk-Aufnahmen kombiniert werden mit einer im Vergleich zu *CLSM*-Aufbauten erniedrigten Aufnahmedauer und Strahlenbelastung für empfindliche Proben. Eine weitere vielversprechende Einsatzmöglichkeit des Aufbaus aufgrund der beliebigen Positionierung eines Laserfokus unterhalb der  $\mu\text{m}$ -Skala ergibt sich in der lokal begrenzten Anregung photoaktivierbarer Proteine [186, 187]. Neben der lokalen Schaltung von Fluorophoren können hierdurch z.B. die neuronale Aktivität adulter Tiere [188], die lokale Transkription in einzelnen Zellen des Embryos [189] und DNA-Modifizierungen in der Keimbahn [190] gesteuert werden. Anwendungen in Kulturzellen umfassen z.B. die Steuerung der Mikrotubulidynamik und der Mitose sowie die Möglichkeit eines lichtinduzierten Zelltods [191]. Im Zusammenhang mit einer sich derzeit durch den Autor dieser Arbeit in Entwicklung befindlichen Ansteuerung für beliebige Bleichformen bzw. -regionen, ermöglicht dies die gezielte Störung und Untersuchung von mannigfaltigen Phänomenen.



### 9.3. Ablationsexperimente

#### Zielsetzung und Motivation

Zur Erweiterung der zuvor vorgestellten Untersuchungen der ungestörten Wurmembryogenese durch die Aufnahme von Langzeitmessungen (siehe Kapitel 5) ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines Aufbaus zur gezielten Photomanipulation in Zellen und Wurmembryonen (siehe Unterkap. 3.3). Ablationsmessungen in Embryonen und adulten Exemplaren des Fadenwurms *C. elegans* wurden bereits in der Vergangenheit ausgiebig genutzt, um unter anderem einzelne Zellen im Wurm [192] oder Embryo [13, 193, 194] abzutöten, Nervenfasern zu durchschneiden [195], Zellen zu verschmelzen [196] und Eihüllen zu perforieren um anschließend z.B. Anteile des Zytoplasmas oder ganze Zellen zu entfernen [197, 198] (siehe [133] für eine Übersicht). Dies ermöglichte Studien über Zellfunktionen und -interaktionen, die Untersuchung neuronaler Prozesse, sowie die Entwicklung erster Modelle zur frühen embryonalen Entwicklung. Im Kontext der in Kapitel 5 vorgestellten Messungen und des daraus resultierenden Modells der frühen Embryogenese kann die Möglichkeit der Manipulation von Zellanordnungen und Teilungszeitpunkten durch Ablationsmessungen hierbei die Beantwortung neuer Fragestellungen ermöglichen. Im Nachfolgenden werden erste exemplarische Ablationsexperimente an frühen Wurmembryonen vorgestellt, um die Einsatzmöglichkeiten des hierfür konzipierten und im Rahmen dieser Arbeit realisierten Aufbaus aufzuzeigen.

#### Probenpräparation und Ablauf einer Ablationsmessung am frühen Embryo

Die Durchführung von Ablationsmessungen erfordert zunächst die genaue Kenntnis des Ablationsfokus bzw. der ausgewählten ROI des Ablationsvorgangs in der Bildebene. Hierfür kann zur Kontrolle der Justage vor jeder Messung eine Mikrolinse in eines Glasobjektträgers gebrannt (siehe Abb. 8.6) und die Position innerhalb der *HoKaWo*-Software markiert werden. Hierfür reicht bei voller Laserleistung des UV-Lasers typischerweise bereits ein Puls aus. Darüber hinaus kann die Position der Mikrolinse in Pixelkoordinaten zusammen mit der Galvoposition zur Eichung innerhalb der Software verwendet werden (siehe Abschnitt B im Anhang), um eine spätere Auswahl der Fokusposition gemäß den gewünschten Pixelkoordinaten zu realisieren. Nach dieser Kalibrationsmessung erfolgt die eigentliche Probenpräparation.

Für Messungen im frühen Embryo sind die ersten Schritte der Ei-Extraktion aus den Würmern identisch zu der in Unterkap. 5.1 beschriebenen Prozedur. Sobald ein passendes Ei (typischerweise frisch befruchtet bzw. vor dem einzelligen Zustand) gefunden wurde, wird dieses mithilfe der Glaskapillare innerhalb eines ca. 5  $\mu$ l großen M9-Tropfens auf ein Deckglas der Abmessungen 24mm  $\times$  60mm, (Stärke #1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgesetzt. Auf den Tropfen wird 2,5  $\mu$ l einer Lösung von 20  $\mu$ m großen Partikeln (Polybead Microspheres, Polysciences Inc, Pennsylvania, USA) in wässriger Lösung hinzu pipettiert und der Tropfen anschließend vorsichtig mit einem zweiten Deckgläschen der Abmessung 20mm  $\times$  20mm, (Stärke #1, Carl Roth) abgedeckt. Die im Tropfen vorhandenen Partikel dienen hierbei als Abstandshalter zwischen den Gläsern und führen zu einer Fixierung und leichtem Druck auf den Embryo. Abschließend werden die Ränder des kleineren Deckgläschen mithilfe eines Pinsels mit einer zuvor auf 90°C aufgewärmten flüssigen Vaseline (Unilever, London, UK) bestrichen, um das Probenvolumen abzuschließen und eine Verdunstung des Mediums bei längeren Messungen zu verhindern. Dieses Protokoll wurde mit freundlicher Genehmigung von Frau Priyanka Dutta übernommen. Eine Markierung der Position des Embryos auf dem Deckglas mithilfe eines Filzstiftes erleichtert die spätere Probenfindung im Mikroskop.

Die versiegelte Probe wird nun am Mikroskop positioniert und die Position des Embryos mithilfe eines 10 $\times$  Objektivs ermittelt, bevor auf das 63 $\times$  Wasserimmersionsobjektiv gewechselt wird. Die Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs anstelle eines Ölimmersionsobjektivs ist hierbei aufgrund des größeren Abstands der untersuchten Probenebene in der Mitte des

Embryos in einer Tiefe von ca. 10 – 15µm zu bevorzugen, um Aberrationen aufgrund eines möglichen Brechungsindexunterschieds zu verringern. Innerhalb der Kontroll-Software müssen vor der Messung die entsprechenden Parameter der Ablationsmessung eingestellt werden. Diese sind nachfolgend mit entsprechenden Werten für die in diesem Kapitel gezeigten Messungen gelistet. Weitere Details zu den einzelnen Parametern der Ansteuerung finden sich im Anhang unter B.

- Laserleistung (491nm / 561nm): je 100mW
- Spinning-Disk-Geschwindigkeit: 5000rpm
- Intensität der Hellfeld-Lampe: *je nach Probe*
- AOTF-Filter (491nm / 561nm): *je nach Probe*
- Anzahl an Stacks (*pre-ablation* / *post-ablation*): 5 / 150 – 300
- Zeit zwischen Einzelstacks: optional / 30s
- Anzahl an Kanälen: 2 – 3
- Kanaleinstellungen (Anregung + Detektion):  
TL / BF + Kein Filter , 491nm + 500 – 550nm, (optional: 561nm + 575 – 625nm)
- z-Stack (Schrittweite / -anzahl, Wartezeit): 1µm / 5, 50ms
- Ablationseinstellungen (Pulsanzahl, Pulsfrequenz): *je nach Probe*
- Galvo-Einstellungen (Startposition x/y, Schrittweite / -anzahl, Iterationen): *je nach Probe*

Im Anschluss wird innerhalb der *HoKaWo*-Software ein Kamera-Stream der entsprechenden Einzelbildanzahl vorbereitet und die Messung im externen Kameratrigger-Modus *Edge* gestartet. Zusätzlich wird der UV-Laser innerhalb der zugehörigen Software im externen Trigger-Modus gestartet. Die Messung kann anschließend über die *LabVIEW*-Setup-Software im Ablations-Modus „UV“ begonnen werden, wenn der gewünschte Zeitpunkt der Entwicklung erreicht wurde. Nach Abschluss der Messung wird die aufgenommene Bilderreihe automatisch als *.HIS*-Format gespeichert und zur späteren Auswertung in *Fiji* in ein *Multipage-Tiff* oder eine serielle Bildersequenz im *.tif* Format konvertiert. Die im weiteren Verlauf dieses Unterkapitels gezeigten Aufnahmen bestehen aus jeweils einer Maximalintensitätsprojektion der einzelnen Schichtaufnahmen der Fluoreszenzkanäle und einer ausgewählten Ebene der Durchlichtaufnahme.

### Dauer des Ablationsvorgangs

Vergleichbar zu Bleichexperimenten erfolgt das Ablationseignis innerhalb einer endlichen Zeit, welche aus der Anpassung der Probenhöhe, der Positionierung und Abgabe des Laserpulses und dem Ein- und Ausklapp der entsprechenden Filterwürfel mit der zugehörigen Softwaredauer der seriellen Kommunikation zusammensetzt. Dies führt zu einer Zeitdifferenz  $\Delta t_{\text{Ablation}}$  gemäß

$$\Delta t_{\text{Ablation}} = N_{\text{Foki}} \cdot (N_{\text{Puls}}/f_{\text{Puls}} + t_{\text{Galvo}}) + t_{\text{z-Stage}} + 2 \cdot t_{\text{Kanal}} + t_{\text{Software}}$$

mit der Fokianzahl  $N_{\text{Foki}}$ , der Pulsanzahl und -frequenz  $N_{\text{Puls}}$  und  $f_{\text{Puls}}$ , der Wartezeit für die Ansteuerung des Galvospiegelpaares  $t_{\text{Galvo}}$ , der Wartezeit für die Ansteuerung der z-Stage  $t_{\text{z-Stage}}$ , der Wartezeit für den Umklapp der Filterwürfel und Belichtungsquelle  $t_{\text{Kanal}}$ , sowie einer zusätzlichen Dauer der softwareinternen Kommunikation  $t_{\text{Software}}$ . Die Dauer des eigentlichen Ablationsvorgangs für die in dieser Arbeit gezeigten Messungen beläuft sich hierbei auf

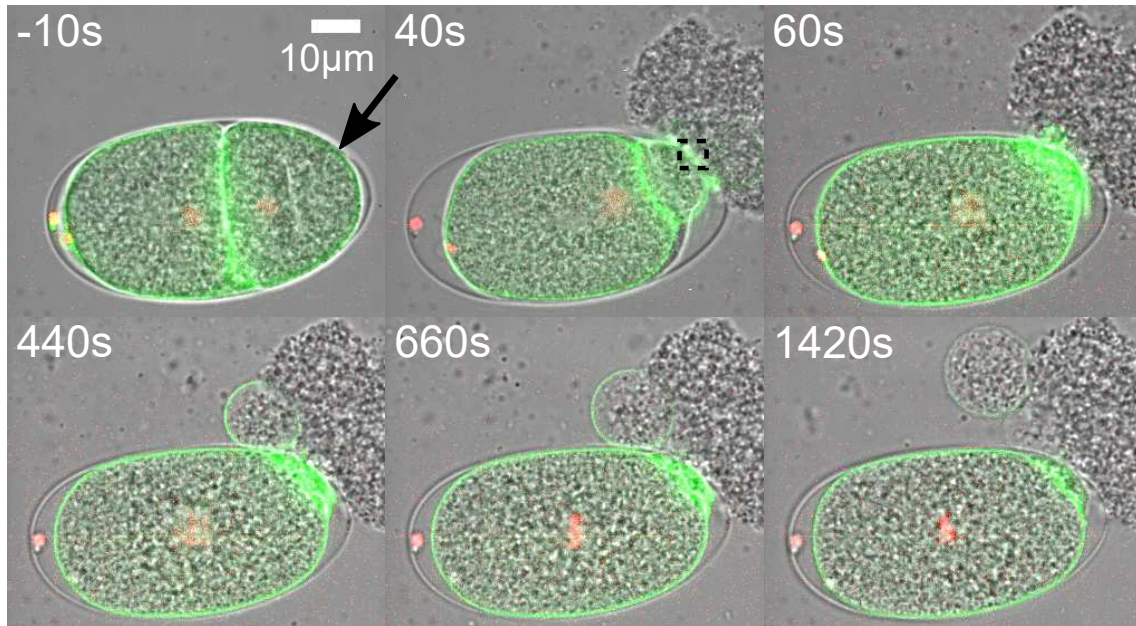
Werte im Bereich von 1ms ( $N_{\text{Foki}} = 1$ ,  $N_{\text{Puls}} = 1$ ,  $f_{\text{Puls}} = 1\text{kHz}$ ,  $t_{\text{Galvo}} = 50\mu\text{s}$ ) bis hin zu 6,25s ( $N_{\text{Foki}} = 25$ ,  $N_{\text{Puls}} = 250$ ,  $f_{\text{Puls}} = 1\text{kHz}$ ,  $t_{\text{Galvo}} = 50\mu\text{s}$ ). Von dem beabsichtigtem Ablationsprozess unabhängig verbleiben die Werte für  $t_{\text{z-Stage}} = 50\text{ms}$ ,  $t_{\text{Kanal}} (1\text{s für Wechsel von Fluoreszenz- auf Durchlichtaufnahmen, } 400\text{ms bei reinen Fluoreszenzaufnahmen})$  und  $t_{\text{Software}} = 1\text{s}$ . Durch die zukünftige, durchgehende Verwendung eines Dichroiten *Di02-R405* (Semrock) in Ablationsmessungen anstelle des Ein- und Ausklapps des bislang verwendeten Spiegels in den Strahlengang entfallen die hierfür nötigen Wartezeiten. Dies ermöglicht die Untersuchung möglicher Effekte direkt nach der Ablation. Die nachfolgend gezeigten Messungen erfolgten noch unter Verwendung des Spiegels.

### **Ablation an der Eihülle eines Embryos**

Einer der ersten publizierten Einsätze eines Ablationsaufbaus an Embryonen von *C. elegans* war die Perforation der Eihülle und die anschließende Extraktion von zytoplasmischen Anteilen einer ausgewählten Zelle [197, 199]. Hierbei wird der Embryo zunächst in ein Medium mit Trypanblau gegeben, woraufhin die Eihülle dieses zu Teilen aufnimmt und sensitiv für die Bestrahlung durch einen Farbstofflaser bei 590nm wird. Im weiteren Verlauf wird z.B. am posterioren oder anterioren Ende des Embryos die Eihülle an einer Stelle, an der kein direkter Kontakt zu Zellen herrscht, durch Laserbestrahlung perforiert und durch Druck auf den sich zwischen zwei Deckgläsern befindlichen Embryo ein Teil der dem Loch in der Eihülle zugewandten Zelle herausgedrückt. Dies wurde unter anderem dafür genutzt einen Teil des Zytoplasmas aus der Zelle zu entfernen. Hierbei trennt sich in einem Teil der so behandelten Embryos der sich außerhalb der Eihülle befindliche Anteil der Zelle vom Rest worauf sich die, die Embryonalzellen umschließende, Lipoprotein-Schicht wieder schließt. Diese Embryonen setzten ihre Entwicklung fort und beenden diese anschließend erfolgreich. Derartige Messungen wurden in früheren Studien genutzt um unter anderem die Bedeutung zytoplasmischer Anteile auf die Zellzyklendauern in der Entwicklung des Embryos zu untersuchen [197, 199] und gingen insofern auch in die Überlegungen zu dem in Kap. 5 verwendeten Modell der Zellzyklendauern ein. In späteren Studien wurden über die gleiche Methodik ganze Zellen aus dem entstandenen Loch vom restlichen Embryo entfernt um deren spezifische Rolle auf die Entwicklung der restlichen Zellen zu untersuchen [198, 200].

Um den Einsatz des in dieser Arbeit vorgestellten Ablationsaufbaus an Wurmembryonen zu testen, wird zunächst eine abgewandelte Form des oben beschriebenen Experiments durchgeführt. Durch eine Perforation der Eihülle an einer Kontaktfläche zwischen Chitinhülle und einer der Zellen eines zweizelligen Embryos wird versucht, die betroffene Zelle aus der Eihülle zu entfernen, um das Verhalten der verbleibenden Zelle ohne den Einfluss der Nachbarzelle zu untersuchen. Hierfür wird in einem entsprechendem zweizelligen Embryo kurz nach der ersten Zellteilung an einem Kontaktpunkt der  $P_1$ -Zelle mit der Eihülle letztere durch einen Ablationsvorgang perforiert (siehe Abb. 9.11). Hierbei erwies sich eine Anzahl von 100 Pulsen bei einer Frequenz von 1kHz als ausreichend. Direkt nach dem Ablationsvorgang kann ein Ausströmen der betroffenen Zelle durch das Loch der Eihülle nach außen beobachtet werden, welches von einer Vergrößerung des Volumens der verbleibenden Zelle begleitet wird. Der zytoplasmische Anteil der perforierten  $P_1$ -Zelle bildet hierbei mitunter membranumschlossene Vesikel, die weitere Zellorganellen enthalten können [199].

Der nach außen gerichtete Fluss, sowie das Anschwellen der verbleibenden Zelle, ist zum einen auf einen hohen hydrostatischen Druck innerhalb des Embryos [200], sowie auf einen vermutlichen Unterschied der osmotischen Konzentration zwischen dem Zellinnerem und der umgebenden Pufferlösung zurückzuführen [200–202]. Die Eihülle selbst besteht aus einer äußeren Vitellinschicht, einer mittleren Chitinhülle und einer innenliegenden CPG-Schicht (*chondroitin proteoglycan*). Innerhalb des Eis befindet sich eine weitere, den Embryo umgebende Perivittel-

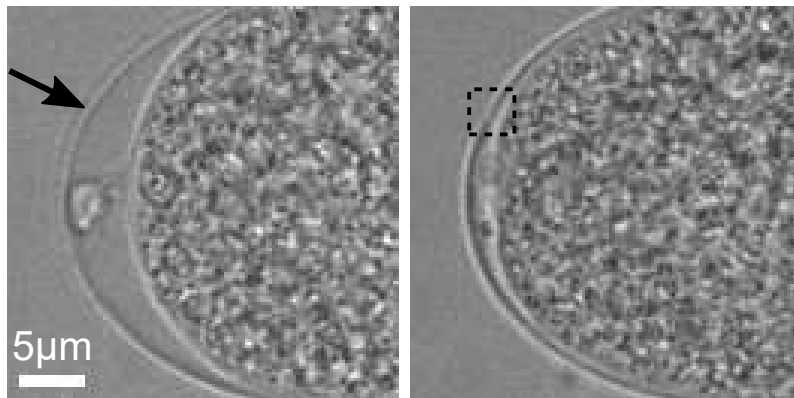


**Abb. 9.11: Zellaustritt durch Ablation der Eihülle**

Gezeigt ist die Zeitreihe einer kombinierten Durchlicht- und der Fluoreszenzaufnahme eines Embryos der Wurmlinie **OD95** im zweizelligen Zustand (*AB* links, *P<sub>1</sub>* rechts). Die Zellmembran ist grün dargestellt, während die Histone rot markiert sind. Die Ablation eines Punkts an der Kontaktfläche zwischen *P<sub>1</sub>* und der Eihülle (roter Stern, 100 Pulse,  $f = 1\text{kHz}$ , volle Laserleistung) zum Zeitpunkt  $t = 0\text{s}$  führt zu einer Perforation der Eihülle und der Membran der Zelle. Ein Unterschied der Osmolarität zwischen dem Inneren des Embryos und dem umgebenden M9-Puffer führt dazu, dass die *P<sub>1</sub>*-Zelle anschließend beinahe komplett aus der Eihülle fließt und die *AB*-Zelle im Inneren der Eihülle anschwillt. Ein Teil des Zytoplasmas der *P<sub>1</sub>*-Zelle bildet ein membranumschlossenes Vesikel, welches sich von den restlichen Zellrückständen ablöst. Die *AB*-Zelle bildet eine im Histonkanal sichtbare Metaphasenplatte zum Zeitpunkt  $t = 660\text{s}$ , schließt die Zellteilung allerdings nicht ab. Stattdessen ist eine Diffusion der Histone durch das Zellinnere zu beobachten.

inschicht, die durch eine Permeabilitätsbarriere von dem, die Embryonalzellen umgebenden, periembryonischen Raum abgetrennt ist [202, 203]. Die Perforation der Eihülle zusammen mit der Permeabilitätsbarriere führt somit zu einem Kontakt der Embryonalzellen zum umgebenden Medium. Vergleichbare Ablationsmessungen früherer Studien [200] sowie Messungen an Embryonen, deren Eihüllenzusammensetzung durch RNAi-Experimente oder mechanische Störungen verändert wurde [201, 202], zeigten ein entsprechendes Anschwellen oder Schrumpfen der Zellen in Abhängigkeit zur Osmolarität des umgebenden Mediums. Eine Messung, innerhalb derer die Eihülle an einer Stelle abseits der Embryonalzellmembran perforiert wurde, zeigt hierbei das erwartete Anschwellen und einen Ausstoß des periembryonischen Raums zwischen Eihülle und Embryonalzelle (siehe Abb. 9.12). In der verbleibenden *AB*-Zelle der Messung aus Abb. 9.11 zeigt sich ca. 10min nach dem Ablationsvorgang die Entstehung einer Metaphasenplatte. Die Zellteilung wird jedoch nicht abgeschlossen, stattdessen diffundiert die Metaphasenplatte unter Beteiligung sichtbarer zytoplasmischer Strömungen durch das Volumen des Embryos, ohne die Teilung der Chromosomen zu vollenden. Eine Störung der *AB*-Zelle aufgrund des Ablationsvorgangs selbst ist unwahrscheinlich, da der Fokus des UV-Lasers relativ weit entfernt lag. Das Anschwellen der Zelle aufgrund des osmotischen Drucks stellt einen weiteren denkbaren Grund des Zellarrests dar. So wurde der Arrest von Zellen in Embryonen mit einer perforierten

Perivitellinschicht in destilliertem Wasser bereits in früheren Publikationen erwähnt [200]. Eine Anpassung der Osmolarität des umgebenden Mediums führte in diesen Versuchen zu einer ausbleibenden Volumenänderung der Zellen und einem Fortsetzen der Zellteilungen. Messungen früherer Studien mit einer reduzierten Laserleistung des Ablationsvorgangs zeigten einen Teil an Embryonen, in denen sich die Perivitellinschicht ca. 30min nach einer kurzzeitigen Perforation wieder schloss, was zu einer normalen Entwicklung der Embryonen führte. Embryonen, bei denen sich die Vitellinschicht aufgrund einer zu großen Perforation nicht wieder schloss, zeigten eine Fehlentwicklung zu Beginn der Gastrulation, bei der sich die Vorgängerzellen des Darmes falsch positionierten. Dies führte zu einem späten Arrest dieser Embryonen in einem als „Monster“-Phänotyp bezeichneten Zustand mit mehreren hundert Zellen [200].



**Abb. 9.12: Anschwellen der Zelle nach Ablation der Eihülle**

Die Durchlichtaufnahme der anterioren Hälfte eines Embryos im Zweizellzustand vor und nach der Ablation eines Punktes an der Eihülle (schwarzer Pfeil, 100 Pulse,  $f = 1\text{kHz}$ ) zeigt das darauffolgende Anschwellen der Zelle. Der periembryonische Raum zwischen Zelle und Eihülle wird hierbei vermutlich durch die perforierte Eihülle (schwarzer Kasten) ausgestoßen.

Neben der neuen Möglichkeit durch die Perforation der Eihülle und der Perivitellinschicht Chemikalien und Farbstoffe in den periembryonischen Raum einzubringen [200], sollen zukünftige vergleichbare Messungen am Lehrstuhl vorrangig dafür genutzt werden, die Entwicklung und Anordnung von Zellen ohne die Einflüsse einer sterischen Behinderung und der Signalgebung anderer Zellen zu untersuchen [194]. Die gezielte Entfernung bestimmter Zellen, sowie der Vergleich der daraus resultierenden Zellanordnungen mit möglichen Vorhersagen aus dem in Kap. 5 vorgestelltem Modell der Zelltrajektorien stellt hierbei einen weiteren eigenen Untersuchungsgegenstand dar, wie auch die Betrachtung des oben beschriebenen Unvermögens von Zellen, die Zellteilung nach einem osmotisch bedingten Anschwellen zu vollenden. Hier soll z.B. ein möglicher veränderter Einfluss des Zytoskeletts auf den entstehenden Spindelapparat untersucht werden.

### **Zellteilungsverzögerung und Zellarrest im frühen Embryo**

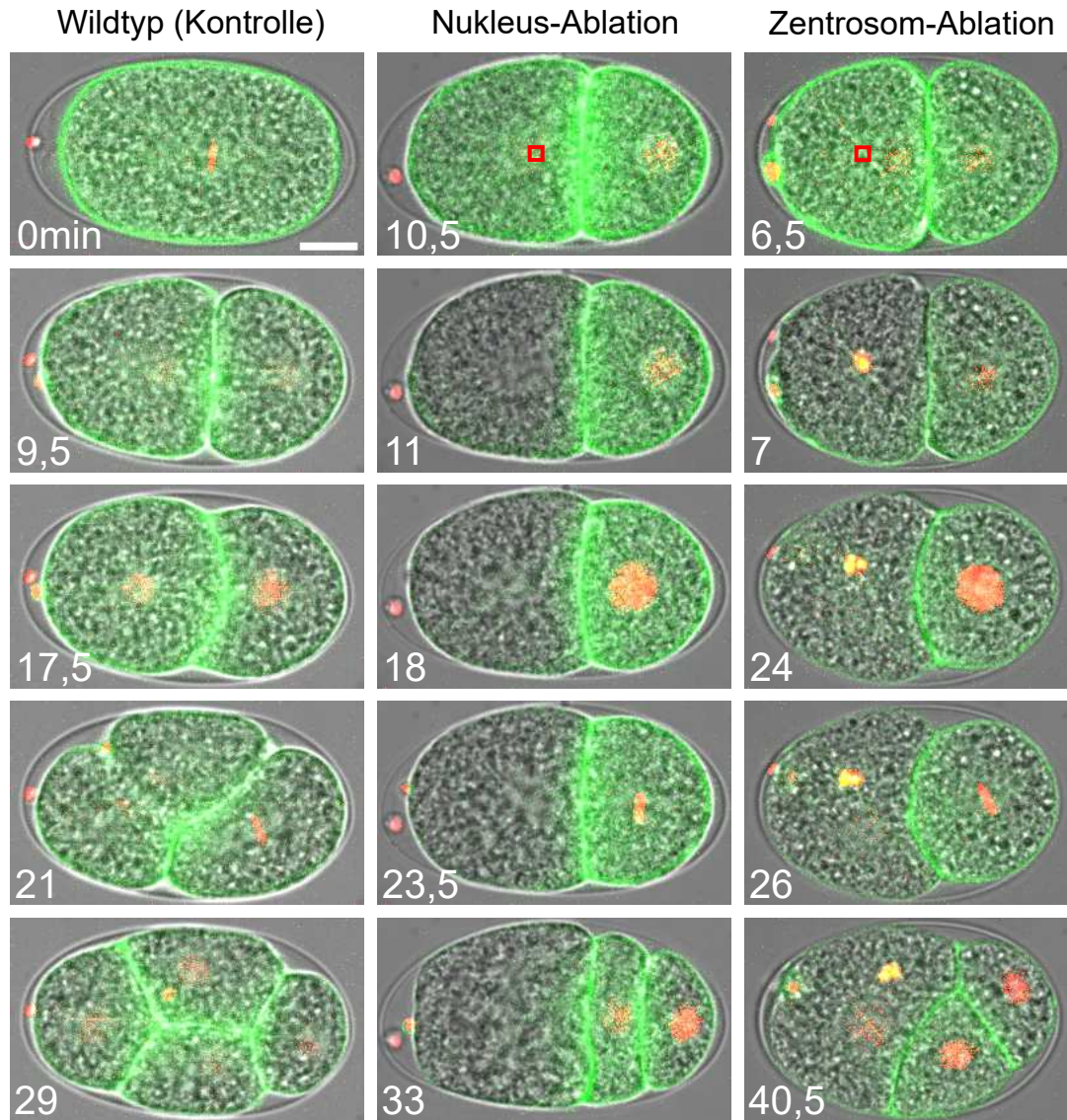
Eine weitere Methode, die Zellanordnung während der frühen Embryogenese unter veränderten Randbedingungen zu testen, ist die Verzögerung der Zellteilung einzelner Zellen oder die Induzierung von Zellarrest. Durch die erste Methode lässt sich die kritische Abfolge von Zellteilungen, die für einen korrekten Ablauf der Embryogenese relevant ist [17, 194], stören. So zeigen z.B. Simulationen innerhalb des Modells aus Kap. 5 das Auftreten aberranter Phänotypen für eine Beschleunigung der Zellteilung der sich ansonsten langsamer teilenden Keimlinie [17]. Durch eine Bestrahlung des Nukleus der zu verändernden Zelle wurden in früheren Studien die Teilungszeiten unterschiedlicher Zellen im frühen Embryo verlängert, was für die Zellen bis

zum 8-Zell-Zustand zum späteren Arrest des Embryos und der Entstehung des bereits erwähnten „Monster“-Phänotypen führte [194]. Zellteilungsverzögerungen für spätere Zellen führten, je nach betroffener Zelle, zum Abschluss der Embryogenese mit vereinzelt Defekten in den geschlüpften Larven [194]. Neben der Verlängerung der Zellteilungszeiten kann eine Zelle durch die Bestrahlung auch gezielt in den Arrest geführt werden, was in der Vergangenheit unter anderem genutzt werden um die Funktion der einzelnen Zellen im frühen Embryo, sowie die Rolle von Zellinteraktionen, z.B. durch *Singaling* zwischen benachbarten Zellen, zu untersuchen [13, 193, 194]. Durch einen gezielten Zellarrest im ansonsten ungestörten Embryo kann so auch die Anordnung der verbleibenden Zellen bzw. der Tochterzellen mit der sterischen Behinderung durch die in der Eihülle verbleibenden Zelle untersucht werden.

Um die Funktionalität des in dieser Arbeit vorgestellten Aufbaus für Ablationsmessungen im Kontext der obigen Experimente zu demonstrieren, werden zunächst Messungen durchgeführt, in denen Zellteilungszeiten über die Bestrahlung des Nukleus einer ausgewählten Zelle verlängert werden. Darüber hinaus wird durch eine ablationsinduzierte Zerstörung des Zentrosoms einer Zelle kurz nach der Zellteilung diese in den Arrest gebracht. Abb. 9.13 und 9.14 zeigen jeweils eine Langzeitaufnahme eines ungestörten Embryos, sowie zweier Embryonen unter Nukleus- und Zentrosom-Ablation über den Zeitraum der frühen Embryogenese. Die Kontrollmessung eines ungestörten Embryos in der linken Spalte zeigt die erste Zellteilung der  $P_0$ -Zelle und die darauffolgende Teilung der  $AB$ -Zelle 19min nach der ersten Zellteilung. 2min später teilt sich nun auch die  $P_1$ -Zelle woraufhin die Teilungsrichtung durch die sterische Wechselwirkung der zwei Tochterzellen  $ABa$  und  $ABp$  vorgegeben ist. Zur Darstellung der Zellanordnungen und zur Bestimmung der Zellzyklendauern wurde hierfür erneut die Linie **OD95** verwendet und alle 30s für insgesamt 200 – 300 Stacks eine Schichtaufnahme mit den oben beschriebenen Parametern durchgeführt.

Eine Zellteilungsverzögerung durch eine Ablation eines Bereichs im Nukleus der  $AB$ -Zelle mit den Abmessungen  $2,8\mu\text{m} \times 2,8\mu\text{m}$  (25 Punkte, je 100 Pulse,  $f = 1\text{kHz}$ ) führt zunächst zu einem sichtbaren Ausbleichen der Fluorophore in der  $AB$ -Zelle (Abb. 9.13, mittlere Spalte). Durch die Bestrahlung des Nukleus wird, je nach Dauer und Energieeinbringung, die Zellteilung der betroffenen Zellen und Ihrer Nachfolgerzellen verlängert [194, 204, 205]. Experimente mit längeren bzw. wiederholten Bestrahlungsdauern des Nukleus führen mitunter zu einem kompletten Zellarrest der betroffenen Zelle [13, 194], einem Ausbleiben der Zellteilung für einen Zeitraum von bis zu zwei Stunden [204] oder einer verzögerten Zellteilung und einem Arrest der beiden Tochterzellen [205], was auch in der hier gezeigten Messung der Fall ist. Während die  $AB$ -Zelle nach dem Ablationsvorgang zunächst in der Interphase verbleibt, setzt in der ungestörten  $P_1$ -Zelle nun die Mitose, leicht verzögert im Vergleich zur Kontrollmessung (siehe Tab. 9), ein und teilt sich nun aufgrund der fehlenden sterischen Wechselwirkung mit den beiden Tochterzellen der  $AB$ -Zelle, entlang der Anterior-Posterior-Achse des Embryos. Diese so entstehende dreizellige Anordnung von  $AB$ ,  $EMS$  und  $P_2$  weicht demnach stark von der Zellanordnung der Kontrollmessung ab und wurde auch in früheren Ablationsmessungen gezeigt [206]. Die nun verspätet einsetzende Teilung der  $AB$ -Zelle führt zu einer mit der Kontrollmessung vergleichbaren Zellanordnung im vierzelligen Zustand (siehe Abb. 9.14). Im weiteren Verlauf der Aufnahme gehen die beiden Tochterzellen  $ABa$  und  $ABp$  in den Arrest, während sich die Tochterzellen der ungestörten  $P_1$ -Zelle weiterhin in der Reihenfolge des Wildtypen teilen, jedoch mit leicht verlängerten Zellzyklendauern im Vergleich zur Kontrollmessung (siehe Tab. 9). Die sich teilenden Zellen ordnen sich hierbei um die beiden Zellen im Arrest an.

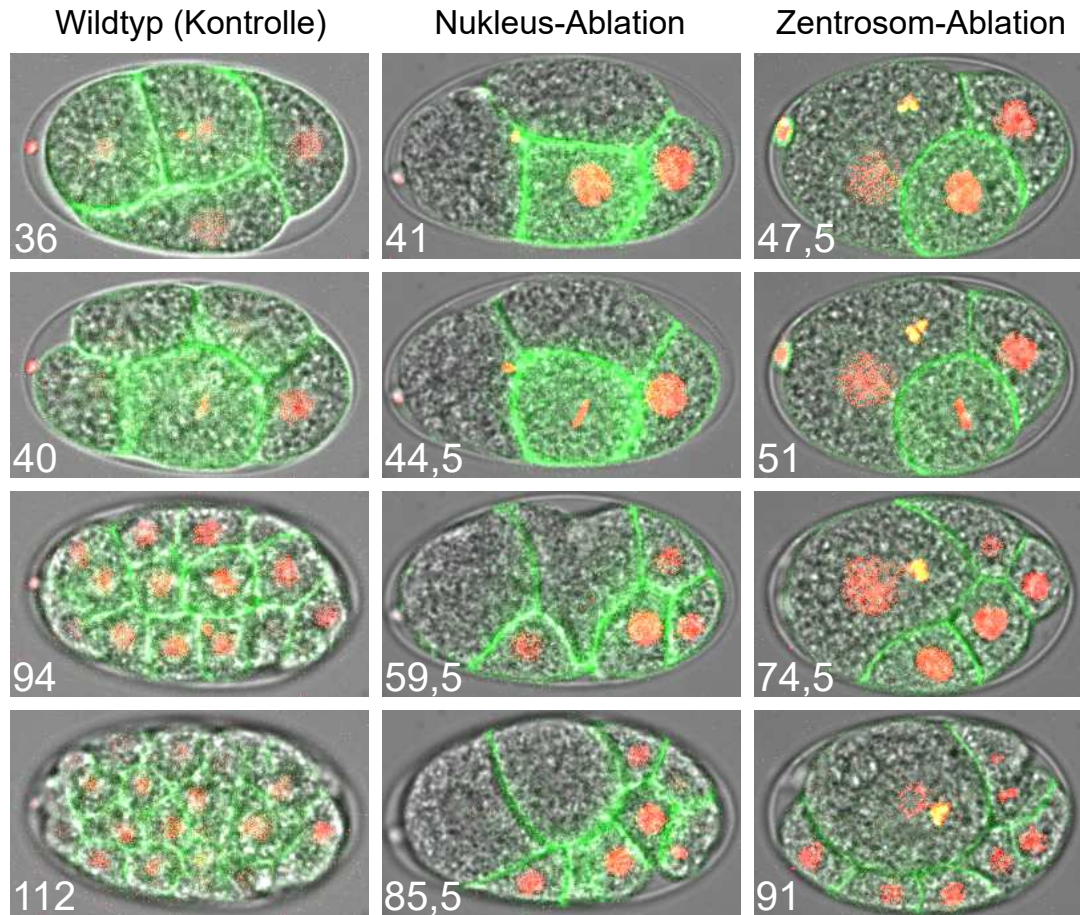
Eine Ablation des im Durchlichtkanal sichtbaren Zentrosoms in der  $AB$ -Zelle in einem Bereich mit den Abmessungen  $2,8\mu\text{m} \times 2,8\mu\text{m}$  (25 Punkte, je 250 Pulse,  $f = 1\text{kHz}$ ) zu einem Zeitpunkt kurz nach der ersten Zellteilung, führt erneut zum Ausbleichen der in der Zelle befindlichen Fluorophore und zur irreversiblen Zerstörung des Zentrosoms. Dies führt zum Unvermögen der



**Abb. 9.13: Zellteilungsverzögerung und Zellarrest nach Ablation (Teil 1 von 2)**

Gezeigt sind die Zeitreihen einer kombinierten Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme von Embryonen der Wurmlinie **OD95** (vgl. Abb. 9.11) ab dem Zeitpunkt der ausgebildeten Metaphasenplatte im Einzeller bei  $t = 0\text{min}$  für einen ungestörten Zustand (links), unter Ablation des anterioren Zellkerns bei  $t = 10,7\text{min}$  (mittig) und unter Ablation des anterioren Zentrosoms bei  $t = 6,7\text{min}$  (rechts). Die Ablation erfolgte hierbei jeweils bei voller Laserleistung in einem Bereich von  $2,8\mu\text{m} \times 2,8\mu\text{m}$  über 25 Punkte mit je 100 Pulsen bei  $f = 1\text{kHz}$  für die Ablation des Nukleus und je 250 Pulsen für die Ablation des Zentrosoms. Nach beiden Ablationsvorgängen ist ein Ausbleichen der Fluorophore in der betroffenen Zelle zu beobachten. Die Ablation des Zentrosoms führt hierbei zur Entstehung einer im roten Kanal deutlich sichtbaren Struktur in der Zelle, welche für die restliche Aufnahme durch die Zelle wandert. Die Ablation des Zellkerns führt zu einer Verzögerung der Teilung der *AB*-Zelle und in Folge dessen zu einer neuen geometrischen Anordnung der posterior entstehenden *P*<sub>2</sub>- und *EMS*-Zelle. Die Ablation des Zentrosoms führt zu einem Zellarrest der *AB*-Zelle und einer ebenfalls abweichenden Zellkonfiguration im Embryo. Für eine weitere Diskussion siehe Fließtext. Die eingezeichnete Längenskala beträgt  $10\mu\text{m}$ . Zweiter Teil der Zeitreihen in Abb. 9.14





**Abb. 9.14: Zellteilungsverzögerung und Zellarrest nach Ablation (Teil 2 von 2)**

Forsetzung der Zeitreihen aus Abb. 9.13. Der weitere Verlauf der Zeitreihe der Nukleus-Ablation zeigt den nach der Zellteilung erfolgten Arrest der *ABa*- und *ABp*-Zelle, während sich die *P*<sub>2</sub>- und *EMS*-Zelle bzw. deren Tochterzellen weiter teilen und in Ihrer Anordnung um die *Aba*- und *ABp*-Zelle anordnen. Die Langzeitaufnahme der Zentrosom-Ablation zeigt den Arrest der *AB*-Zelle und die Anordnung der Tochterzellen der *P*<sub>1</sub>-Zelle und die *AB*-Zelle. Die Teilungszeiten der ungestörten Zellen ist hierbei leicht verzögert im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tab. 9).

Zelle ohne Zentrosom bei der darauffolgenden Zellteilung einen Spindelapparat auszubilden und somit zum effektiven Arrest dieser Zelle [207]. An der Stelle des Ablationsvorgangs entsteht eine im Fluoreszenzkanal sichtbare Struktur, die daraufhin durch das Zytoplasma der *AB*-Zelle wandert. Im weiteren Verlauf der Aufnahme teilt sich nun die *P*<sub>1</sub>-Zelle ungefähr 5min später im Vergleich zur Kontrollmessung und unter einem leichten Winkel zur AP-Achse, der in diesem Fall nicht durch sterische Wechselwirkung mit Nachbarzellen begründet werden kann. Im Vergleich zur Messung der Nukleus-Ablation ist hier eine stärkere Eindellung der *AB*-Zelle durch die mitotische Abrundung der *P*<sub>1</sub>-Zelle zu bemerken, so dass hier die *AB*-Zelle verformbarer scheint und eine beliebige Positionierung der Spindel in der *P*<sub>1</sub>-Zelle begünstigt. In vergleichbaren Aufnahmen einer Zentrosom-Ablation konnte auch hierfür eine Teilung der *P*<sub>1</sub>-Zelle entlang der AP-Achse beobachtet werden. Die Tochterzellen der *P*<sub>1</sub>-Zelle setzen im weiteren Verlauf der Aufnahme die Abfolge der Zellteilungen im Wildtypen fort und ordnen sich um die *AB*-Zelle herum an (siehe Abb. 9.14). Hierbei ist eine im Vergleich zur Kontroll- und Nukleus-Ablationsmessung verlängerte Zellzyklendauer zu vermerken. Der Grund für die



verlängerten Zellzyklendauern der ungestörten  $P_1$ -Zelle und ihrer Tochterzellen in beiden Ablationsmessungen könnte in einer teilweisen Schädigung der DNA aufgrund von Streulicht während des Ablationsvorgangs liegen. Frühere Studien berichteten für vergleichbare Ablationsmessungen eine Verlangsamung der Zellteilung in den ungestörten Zellen um ca. 5-30% [193], was im Rahmen der Vergrößerung der aus den hier gezeigten Messungen ermittelten Zellzyklendauern liegt (siehe Tab. 9). Eine größere Energieeinbringung durch die 2,5-fache Erhöhung der Pulsanzahl in der Zentrosom-Ablationsmessung im Vergleich zur Nukleus-Ablation würde insofern auch die vergleichsweise größere Erhöhung der Zellzyklendauern erklären.

Zelle	SPIM ( $T = 20^\circ\text{C}$ )	Kontrolle (SD)	Nukleus-Abl.	Zentrosom-Abl.
<i>AB</i>	(18,08 $\pm$ 1,07) min	19,0 min	33,0 min	Arrest
$P_1$	(20,17 $\pm$ 1,29) min	21,0 min	23,5 min	26,0 min
<i>ABa</i>	(17,56 $\pm$ 0,68) min	17,0 min	Arrest	Arrest
<i>ABp</i>	(19,45 $\pm$ 0,76) min	17,0 min	Arrest	Arrest
<i>EMS</i>	(20,40 $\pm$ 0,94) min	19,5 min	21,0 min	25,0 min
$P_2$	(24,65 $\pm$ 1,08) min	24,0 min	26,0 min	31,0 min
<i>MS</i>	(23,00 $\pm$ 1,12) min	21,0 min	26,0 min	29,5 min
<i>E</i>	(24,67 $\pm$ 1,15) min	22,5 min	26,5 min	30,0 min
<i>C</i>	(24,61 $\pm$ 1,39) min	22,5 min	26,5 min	31,5 min
$P_3$	(33,44 $\pm$ 1,29) min	29,5 min	34,0 min	42,5 min

**Tab. 9: Zellzyklendauern für Ablationsmessungen an *AB***

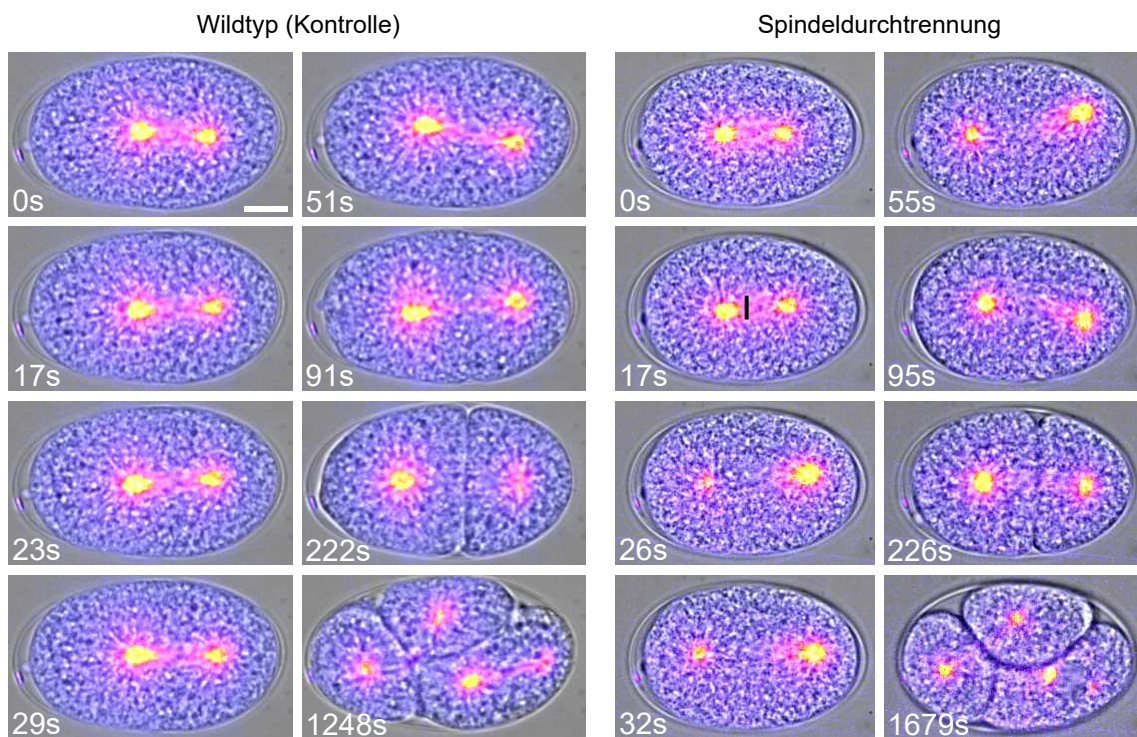
Gelistet sind die Zellzyklendauern, gemessen von Metaphase der Mutterzelle bis zur Metaphase der untersuchten Zelle, für SPIM-Messungen bei  $T = 20^\circ\text{C}$ , sowie für die in Abb. 9.13 und 9.14 gezeigten Messungen am Ablationsaufbau (gemessen bei Raumtemperatur  $T = 21^\circ\text{C}$ ). Während die Kontrollmessung die Werte aus den SPIM-Messungen widerspiegelt, zeigt die Nukleus-Ablation der *AB*-Zelle eine deutlich verlängerte Zellzyklendauer (Fehler jeweils  $\pm 0,25$  min gemäß der halben Zeitauflösung der Aufnahme). Die Zellzyklendauern der  $P_1$ -Zelle bzw. ihrer Tochterzellen ist in beiden Ablationsmessungen im Vergleich zur Kontrollmessung leicht erhöht, was auf einen möglichen Einfluss der UV-Strahlung auf das Erbgut der  $P_1$ -Zelle hindeuten könnte. Die im Vergleich zur Nukleus-Ablation verlängerten Zellzyklendauern der Zentrosom-Ablation könnten dementsprechend auch in der dort erhöhten Belastung aufgrund der höheren Pulsanzahl begründet liegen.

Die hier vorgestellten Messungen zeigen die Möglichkeit der Durchführung interzellulärer Manipulationen durch Ablation intrazellulärer Bestandteile in frühen Embryonen von *C. elegans*. In zukünftigen Experimenten am Lehrstuhl sollen nun unter anderem die durch Zellteilungsverzögerungen und Zellarrest induzierten Auswirkungen auf die Zellanordnung während der frühen Embryogenese erfasst und mit Vorhersagen aus dem physikalischen Modell aus Kap. 5 verglichen werden.

### Spindeldurchtrennung im frühen Embryo

Neben der Manipulation auf interzellulärer Ebene lassen sich durch die feine Auflösung des Ablationsfokus auch intrazelluläre Prozesse manipulieren und deren Effekte untersuchen. Hierfür soll in einem Ablationsexperiment an einem Embryo zum Zeitpunkt der Anaphase der ersten Zellteilung die Mikrotubuli des Spindelapparats durchtrennt und die Effekte auf die Zentrosome des Spindelapparats verfolgt werden. Während der ersten Zellteilung wird die Spindel aus dem Zentrum des Embryos entlang der AP-Achse in die posteriore Richtung verschoben, wobei auf die beiden Zentrosome über die Astralmikrotubuli, welche mit dem Cortex der Zelle verbunden

sind, Zugkräfte ausgeübt werden. Eine Asymmetrie dieser Kräfte hin zu einem stärkeren Zug auf posteriorer Seite führt so einer relativen Verschiebung der Spindel und der Metaphasenplatte in die posteriore Richtung [130, 208]. Da die Position der Zelleinschnürung während der Zytokinese und damit auch die Volumina der Tochterzellen von der Position der Spindelmittle und der Zentrosomen abhängt, resultiert dies in einer geometrisch asymmetrischen Zellteilung der  $P_0$ -Zelle [209]. Eine Durchtrennung der Spindel innerhalb der Anaphase durch Laser-Ablation sollte demnach zu einer rapiden, beschleunigten Entfernung der beiden Zentrosome voneinander weg mit einer erhöhten Geschwindigkeit und zurückgelegten Distanz des posterioren Zentrosoms führen [208]. Die Trennung der Chromosomen findet in einer Zelle in der Mitose auch nach dieser Spindeldurchtrennung und selbst nach der Zerstörung beider Zentrosomen durch eine nach außen gerichtete Kraft in der Spindelmittle statt [207].

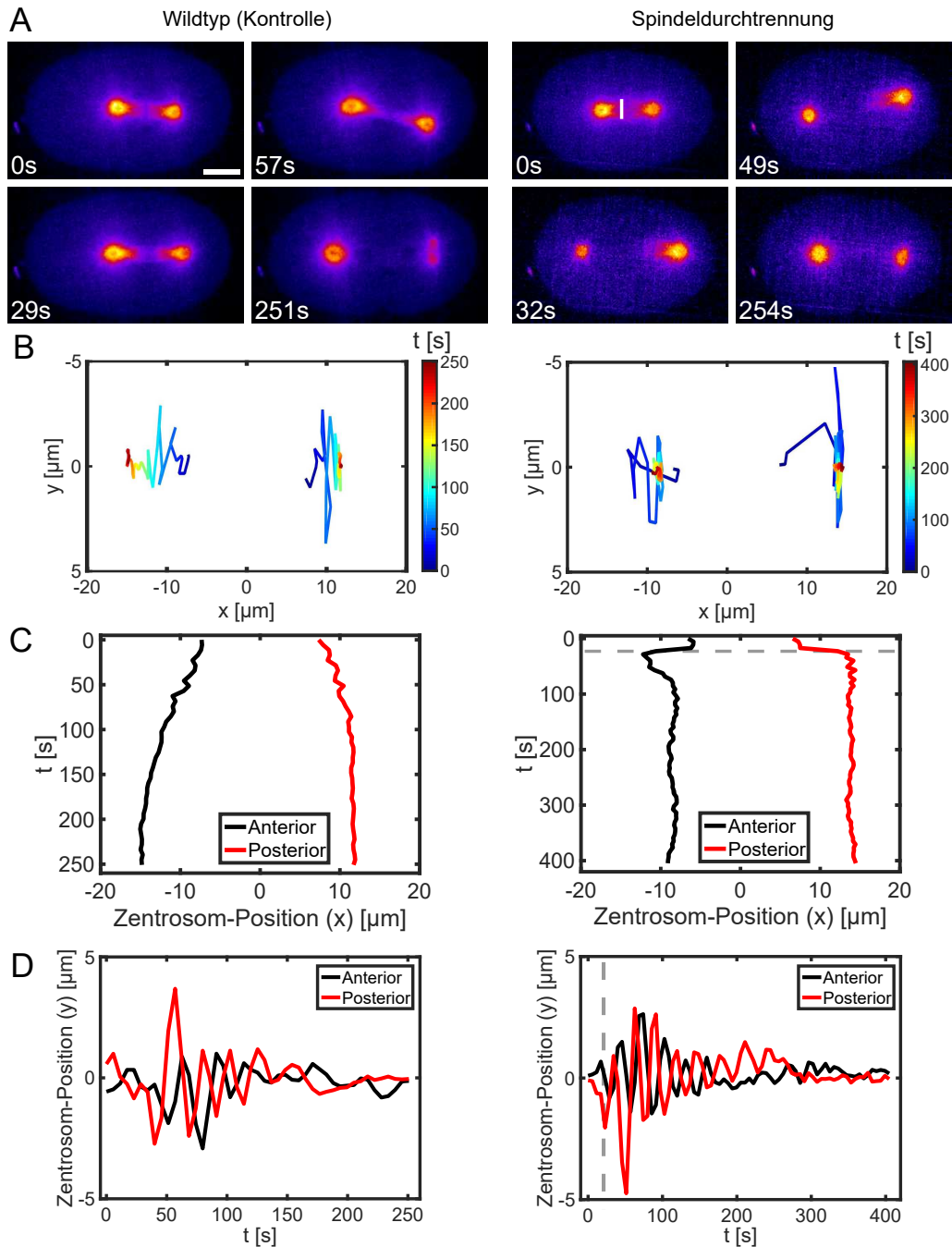


**Abb. 9.15: Spindeldurchtrennung während der ersten Zellteilung**

Gezeigt sind Zeitreihen einer kombinierten Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme von Embryonen der Wurmlinie **OD3** zum Zeitpunkt der ersten Zellteilung. Im Fluoreszenzkanal (orange) sind über die Fluoreszenzmarkierung des  $\alpha$ -Tubulins die Spindel und die beiden Zentrosomen zu erkennen. Links ist die Aufnahme eines ungestörten Embryos als Kontrolle dargestellt, während rechts zum Zeitpunkt  $t = 23s$  die Spindel entlang des schwarz markierten Balkens bestrahlt wird. Hierbei wurden 5 Punkte mit einem Abstand von je 562nm abgefahren und jeweils 100 Pulse mit  $f = 1kHz$  bei voller Laserleistung abgegeben. Die daraus resultierende Durchtrennung der Spindel führt zu einer plötzlichen Bewegung der beiden Zentrosomen in Richtung des Cortex und wird von einer langsameren Ausrichtung des anterioren Cortex (links) zurück in die Mitte der zukünftigen Tochterzelle gefolgt. In beiden Messreihen ist nun zunächst eine Oszillationsbewegung der Spindel zu bemerken, bis die Zellteilung durch die Einschnürung der Membran abgeschlossen wird. Beide Tochterzellen teilen sich auch nach der Spindeldurchtrennung erneut, wobei die Teilung der *AB*-Zelle (links) im Vergleich zum ungestörten Embryo ungefähr 7min später erfolgt. Die eingezeichnete Längenskala beträgt 10 $\mu$ m.

Zur Durchführung einer Spindeldurchtrennung wird ein frisch befruchteter Embryo nach der oben beschriebenen Methode präpariert und für die Ablationsmessung vorbereitet. Hierbei wird die Wurmlinie **OD3** mit einer Fluoreszenzmarkierung des  $\alpha$ -Tubulin-Netzwerkes (*GFP::tba-2*) verwendet, um die Zentrosomen und den Spindelapparat zu betrachten. Abb. 9.15 zeigt den Verlauf einer Kontrollmessung und einer Messung, in der die Spindel durchtrennt wurde. Hierfür werden innerhalb der Anaphase (sichtbar an einer beginnenden Verschiebung des posterioren Spindelpols) durch die Ablation einer ca. 2,5  $\mu\text{m}$  langen Linie aus 5 Punkten im Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  (je 100 Pulse bei  $f = 1\text{kHz}$ ) quer zur Spindel die Kinetochor- und Polmikrotubuli durchtrennt. Hierbei wird darauf geachtet, die Spindel leicht anterior versetzt zur Mitte zu durchschneiden, um die Chromosomen, die nur wenige  $\mu\text{m}$  daneben positioniert sind, nicht zu stark durch die UV-Strahlung zu schädigen. Während innerhalb der Kontrollmessung ein langsames Auseinanderdriften der fluoreszenzmarkierten Zentrosome zu beobachten ist, führt der Ablationsvorgang zu einem plötzlichen Auseinanderreißen der beiden Zentrosome. In beiden Messungen ist im weiteren Verlauf die Oszillation der Spindel bzw. der beiden Zentrosomen aufgrund ungleichmäßiger kortikaler Krafteinwirkungen zu erkennen [210]. Beide Embryonen schließen die Zellteilung daraufhin zu vergleichbaren Zeitpunkten mit der Einschnürung der Zellmembran ab. Der Embryo zeigt auch nach der Ablationsmessung eine erfolgreiche Zellteilung der *AB*-Zelle und eine entsprechende Zellanordnung vergleichbar zum Wildtypen. Der Zeitpunkt dieser Zellteilung ist im Vergleich zur Kontrollmessung um ca. 7min verspätet, was wahrscheinlich auf den Einfluss der UV-Strahlung auf die DNA während der Ablationsmessung zurückgeführt werden kann. Eine genauere Untersuchung der Zentrosomtrajektorien erfolgt über ein intensitätsbasiertes Tracking des Fluoreszenzkanals durch die bereits zuvor in dieser Arbeit verwendete *TrackMate*-Software (siehe Unterkap. 6.2). Das Ergebnis dieser Auswertung für die beiden in Abb. 9.15 gezeigten Messungen ist in Abb. 9.16 gezeigt. Der Koordinatenursprung der Trajektorien wurde hierbei in den Mittelpunkt zwischen den beiden Zentrosomen in der ersten Aufnahme gelegt. Die Kontrollmessung zeigt die aus der Literatur bekannte langsame Distanzierung der beiden Zentrosome entlang der AP-Achse ( $x$ ), sowie die Oszillationen der Zentrosome in der zur Spindelausrichtung senkrecht stehenden  $y$ -Achse. Im Gegensatz zur Literatur ist in dieser Messung eine stärkere Bewegung des anterioren Zentrosoms in anteriorer Richtung auffällig, wobei der Mittelpunkt des Spindelapparats bereits vor dem Beginn der Messung zur posterioren Seite hin verschoben ist. Ein möglicher Grund könnte eine stärkere Kompression des Embryos in dieser Messung durch die Art der Probenpräparation zwischen zwei Deckgläsern sein, was auch zu einer sichtbaren Vergrößerung des dargestellten Embryoquerschnitts im Vergleich zur Ablationsmessung resultiert. Die Trajektorien der Ablationsmessung zeigen deutlich den Effekt der Spindeldurchtrennung in Form einer plötzlichen Distanzvergrößerung der Zentrosome. Das anteriore Zentrosom reagiert mit einer posterioren Bewegung zurück zur zukünftigen Zellmitte der entstehenden *AB*-Zelle, wahrscheinlich aufgrund rückstellender Kräfte der Astralmikrotubuli, während das posteriore Zentrosom seine Position entlang der  $x$ -Achse nahezu unverändert beibehält. Des Weiteren ist eine bereits in früheren Studien berichtete Vergrößerung der maximalen Amplitude der posterioren Oszillationen in der  $y$ -Achse um einen Faktor von ca. 25% zu beobachten.

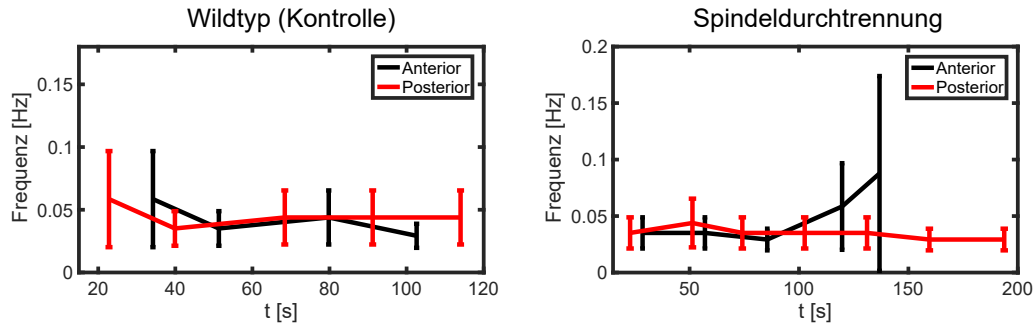
Die Frequenz der Oszillationen, bestimmt aus den Zeitabständen der Minima der Trajektorien in  $y$  (siehe Abb. 9.17), zeigt einen zeitlich abnehmenden Trend für die Kontrollmessung mit einer Anfangsfrequenz von  $f = (58 \pm 38)\text{mHz}$ , der im Rahmen der Fehler mit dem Wert für das posteriore Zentrosom von  $f = (51 \pm 8)\text{mHz}$  aus anderen Studien übereinstimmt [210]. Die Oszillation der Zentrosome in der Ablationsmessung zeigt eine bzgl. der Kontrollmessung erniedrigte Startfrequenz von  $f = (35 \pm 14)\text{mHz}$  sowie einen Trend zu niedrigeren Frequenzen für das posteriore und eine Erhöhung der Frequenz des anterioren Zentrosoms, vermutlich aufgrund der durch die Ablation gestörten Kräfteübertragung durch das Mikrotubulinetzwerk.



**Abb. 9.16: Zentrosomtrajektorien nach der Spindeldurchtrennung**

(A) Fluoreszenzkanal der Aufnahmen aus Abb. 9.15. Der weiße Balken in der rechten Messung zeigt die Position der Spindeldurchtrennung. Die eingezeichnete Längenskala beträgt  $10\mu\text{m}$ . (B) Die Trajektorien der beiden Zentrosome aus einer Tracking-Auswertung mit farblich kodiertem Zeitverlauf zeigen zum einen die Oszillationsbewegung in einer Richtung orthogonal zur Anterior-Posterior-Achse (hier: von links nach rechts) und zum anderen den Effekt der Spindeldurchtrennung in der rechten Messung. (C) Die zeitliche Position entlang der Anterior-Posterior-Achse zeigt für die Kontrollmessung einen stetig anwachsenden Abstand der beiden Zentrosome zueinander, während in der Auswertung der Ablationsmessung der Moment der Spindeldurchtrennung (graue gestrichelte Linie) in den auseinandergerissenen Zentrosomen sichtbar wird. Kurze Zeit danach findet eine Rückbewegung des anterioren Zentrosoms statt. (D) Die Oszillationsbewegungen der Spindel zeigen sich in den Zentrosompositionen orthogonal zur Anterior-Posterior-Achse.

Die Oszillationen des anterioren und posterioren Zentrosoms bleiben auch nach der Ablation noch zueinander phasenverschoben, was entweder auf Effekte verbleibender Polmikrotubuli zwischen den Zentrosomen, eine andere Art der Kopplung, z.B. über das Zytoplasma, oder eine andersartige Synchronisation der zugrundeliegenden Kortexaktivität hindeutet.



**Abb. 9.17: Frequenzen der Spindeloszillationen**

Aus dem Abstand der Minima der Zentrosomtrajektorien aus Abb. 9.16 (D) wurde der zeitliche Verlauf Frequenzen der anterioren und posterioren Zentrosome während der Spindeloszillationen ermittelt. Hierbei ist ein leicht abnehmender Trend der Kurven der Kontrollmessung sowie des posterioren Zentrosoms in der Ablationsmessung zu bemerken, während die Frequenz des anterioren Zentrosoms zuletzt einen Anstieg erfährt. Der Fehler ergibt sich aus der Zeitauflösung der Aufnahme von  $\Delta t = 5, 7s$ .

Neben den Untersuchungen der Kräfte und Mechanismen des Spindelverhaltens kann die asymmetrische Durchtrennung der Spindel auch dafür genutzt werden, die Asymmetrie der ersten Zellteilung gezielt zu beeinflussen. Durch die Durchtrennung der Spindel an einer Stelle nahe einer der beiden Zentrosomen zum Zeitpunkt der Anaphase wird die Spindelmittle aufgrund der Zugkräfte zur Position des zweiten Zentrosoms verschoben. Hierauf bildet sich zunächst eine Einschnürung der Zellmembran an einer Position zwischen den beiden Zentrosomen und einer verspäteten zweiten Einschnürung an der verschobenen Position der Spindelmittle [209]. Eine Verschmelzung der beiden Einschnürungen führt dann zur letztendlichen Teilungsposition der Tochterzellen. Eine asymmetrische Spindeldurchtrennung auf anteriorer Seite vergrößert somit das Volumen der entstehenden *AB*-Zelle, während eine posteriore Durchtrennung zu einer Vergrößerung der *P<sub>1</sub>*-Zelle führt [209]. Dies soll in zukünftigen Experimenten genutzt werden, um die in Kap. 5 vorgestellten Resultate der zellgrößenabhängigen Teilungszeiten einzelner Zellen, sowie die Auswirkungen auf die spätere Embryogenese zu untersuchen.

### Ausblick

Die in diesem Unterkapitel vorgestellten Ablationsmessungen an frühen Wurmembryonen zeigen deutlich die Möglichkeiten gezielter Manipulationen in vielzelligen Organismen und auch einzelnen Zellen. Trotz einzelner Nebeneffekte, wie verlängerter Zellzyklendauern aufgrund der UV-Bestrahlung, ist durch die hohe Präzision des Aufbaus so z.B. eine Adressierung einzelner Zellen und sogar von Zellbestandteilen auf der  $\mu m$ -Skala möglich, ohne umliegende Zellen zu stören oder die grundlegende Funktionsfähigkeit der Zelle zu verlieren. Dies erweitert die am Lehrstuhl zur Verfügung stehenden Techniken und ermöglicht die Untersuchung neuer, unterstützender Fragestellungen an bestehenden Projekten im Bereich der frühen Embryogenese von *C. elegans*. Der Einsatz des Aufbaus beschränkt sich hierbei nicht auf Wurmembryonen sondern ermöglicht auch Messungen an Kulturzellen z.B. im Hinblick auf Störungen an Netzwerken durch Ablationsereignisse und die Untersuchung nachfolgender Einflüsse auf deren Dynamik.

---

---

## Teil IV.

# Zusammenfassung

## 10. Fazit und Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein bereits bestehender Aufbau eines Lichtblattnikroskops zur Erstellung fluoreszenzmikroskopischer dreidimensionaler Langzeitaufnahmen weiterentwickelt. Hierbei wurde neben der neuen Möglichkeit zur Aufnahme von Mehrkanalmessungen die Beleuchtungsdauer und somit möglicher Photostress der Probe durch den Einbau eines akustooptischen Filters auf ein Minimum reduziert. Zudem wurde die Ausleuchtung der Probe durch die Implementierung eines geschriebenen Lichtblatts verbessert. Aufgrund dieser baulichen Veränderungen sowie durch die Anpassung der Aufbauansteuerung über die Verwendung eines Multifunktionsdatenerfassungsmoduls wurde die Bearbeitung neuer Fragestellungen durch längere Aufnahmedauern bei geringeren Bleicheffekten und gleichzeitiger Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen ermöglicht.

Dies erlaubte weiterführende Messungen der frühen Embryogenese des Fadenwurms *C. elegans*, welche im Zusammenhang mit der Promotionsarbeit von Herrn Rolf Fickentscher unter anderem zu der Weiterentwicklung eines Modells der frühen Zellanordnung führte. Zudem konnten neue Erkenntnisse bezüglich einer Volumenabhängigkeit der Zellzyklendauern sowie der Entstehung von Asymmetrien in Zellteilungen und deren Einfluss auf die Embryonalentwicklung erlangt werden [16, 17, 145]. Eine Fortführung dieser Untersuchungen am Lehrstuhl zur Beschreibung der späteren Embryogenese ist geplant und wurde bereits im Rahmen einer Bachelorarbeit von Herrn Sebastian Krauß initiiert [211]. Das Ziel ist eine Beschreibung der Zellanordnungen auch nach dem Einsetzen der Gastrulation über eine mögliche Berücksichtigung aktiver Zellverformungen und -bewegungen. Eine potentielle Erweiterung des Modells um biochemische Einflüsse ist ebenso geplant wie weitere Untersuchungen der Spindelausrichtungen bzw. Teilungsachsen und deren Abhängigkeiten.

Eine Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten des SPIM-Aufbaus durch die Implementierung von drei unterschiedlichen Techniken zur Diffusionsmessung ermöglichte über Messungen an Eichproben einen Vergleich der verwendeten Techniken. Hierbei konnten methodenspezifische Vor- und Nachteile bezüglich unterschiedlicher Probeneigenschaften und aufbauspezifischer Parameter unter Zuhilfenahme von Simulationen herausgestellt werden. Eine Publikation der aus diesen Messungen gewonnen Erkenntnisse befindet sich zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit in der Entstehung. Zur einfacheren Probenpräparation und der zukünftigen Implementierung von Kreuzkorrelationsmessungen in SPIM-FCCS-Experimenten wurde zudem ein neuer Abschnitt des SPIM-Aufbaus konzipiert, gebaut und bereits für erste DDM-Messungen im Rahmen der Bachelorarbeit durch Herrn Lukas Weihmayr eingesetzt [137].

Basierend auf den Ergebnissen der Messungen an Eichproben wurde in einem weiteren Schritt die Diffusion zweier unterschiedlicher Proteine während der frühen Wurmembryogenese mittels SPIM-FCS quantifiziert. Die Messung der Diffusion und Bindungskinetik des peripheren Membranproteins PLC1 $\delta$ 1 in unterschiedlichen Zellkompartimenten stellt hierbei den ersten berichteten Einsatz dieser Technik in einem der elementaren Modellsysteme der Entwicklungsbiologie dar und deckt sich in ihren Ergebnissen mit bereits zuvor publizierten Werten unter Verwendung anderer Techniken [103]. Nach dieser Validierung der Methode für den Einsatz in lebenden Proben ermöglichten Messungen an dem Protein PIE-1 in der frühesten Entwicklungsphase des Embryos die räumliche und zeitliche Verfolgung der Diffusionsgradientenentwicklung einer kritischen Keimbahndeterminante. Weiterführende Ergebnisse aus der Masterarbeit von Herrn Dirk Hofmann [141] sowie zusätzliche Messungen an dem an der Diffusionsgradientenentstehung beteiligten Protein MEX-5 sollen hierbei im Zusammenhang mit bereits bestehenden Simulationen ein Modell der Gradientenentwicklung liefern und demnächst publiziert werden.



Zur Erweiterung der Möglichkeiten der Probenmanipulation und -aufnahme für die Untersuchung von Schlüsselprozessen und Mechanismen der frühen Embryogenese wurde in dieser Arbeit zudem ein neuer Aufbau konzipiert, gebaut, charakterisiert und erfolgreich getestet.

Der SD-FRAP-Ablationsaufbau erlaubt zum einen die Erstellung von höchstauflösenden Mikroskopieaufnahmen nach der ISM-Methode und liefert hierbei einen lateralen Auflösungsgewinn um eine Faktor von bis zu 1,52 mit Werten der Auflösungen von bis zu 152nm. Dies ermöglicht auch, insbesondere im Kontext von Projekten am Lehrstuhl bezüglich der Untersuchung zellulärer Netzwerke [179, 181], einen wertvollen potentiellen Gewinn an Information und Datenqualität. Zukünftige Projekte beinhalten beispielsweise Aufnahmen des ER- und Golgi Apparatzes in Zellen und Wurmembryonen mit dem Ziel einer quantitativen Beschreibung der Organellendynamik.

Ergebnisse erster Bleichmessungen an Kulturzellen und Wurmembryonen zeigen die Möglichkeiten des Aufbaus zur Quantifizierung der Bindungskinetik und der Proteindiffusion durch die freie Wahl einer benutzerdefinierten Bleichregion. Während die Ergebnisse der Bindungskinetikmessungen mit den Werten früherer Studien unter Verwendung kommerzieller Systeme übereinstimmen, zeigen Messungen schneller Diffusionsprozesse bisweilen noch eine Limitierung aufgrund einer konzeptionell bedingten Totzeit zwischen dem Bleichereignis und der Messung der diffusionslimitierten Fluoreszenzerholung. Zukünftige bauliche Anpassungen sowie eine Veränderung der Softwarearchitektur ermöglichen hier eine Kompensation dieser Problematik.

Den Abschluss dieser Arbeit bilden erste erfolgreiche Ablationsmessungen an frühen Wurmembryonen. Durch die minimalinvasive Manipulation mithilfe eines nahezu beugungsbegrenzten Ablationsfokus konnten selbst Strukturen in der Größenordnung von wenigen 100nm adressiert und zerstört werden, ohne umliegende Strukturen negativ zu beeinflussen oder die biologische Funktionsfähigkeit des Organismus zu beeinträchtigen. Dies ermöglichte unter anderem den gezielten Eingriff in Zellteilungsdauern und die Manipulation der daraus folgenden Zellanordnungen. Zukünftige derartige Messungen sowie eine Änderung der physikalischen Randbedingungen durch Ablationsexperimente an der Eihülle erlauben eine weiterführende Überprüfung der Ergebnisse aus den zuvor getätigten Langzeitmessungen der frühen Embryogenese und den Vorhersagen aus dem daraus abgeleiteten Modell.

Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Forschungsprojekten war eine weitere Motivation die langfristige Etablierung der Versuchsaufbauten und Messtechniken am Lehrstuhl. Hierbei lag ein Fokus auf der Nutzerfreundlichkeit und der Anpassungsfähigkeit der Aufbauten für zukünftige Projekte. Während der Erstellung dieser Arbeit wurden die hier vorgestellten Aufbauten im Rahmen von drei Bachelorarbeiten [137, 211, 212] und zwei Masterarbeiten [141, 181] verwendet. Neben der vorliegenden Arbeit werden die Aufbauten darüber hinaus auch in den Projekten zweier weiterer, derzeit am Lehrstuhl entstehender Promotionsarbeiten verwendet.

Ein abgewandelter Nachbau des hier vorgestellten SPIM-Aufbaus entstand auf Anfrage im Juni 2017 unter Hilfestellung des Verfassers dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Akatsuki Kimura am *National Institute of Genetics* in Mishima, Japan.

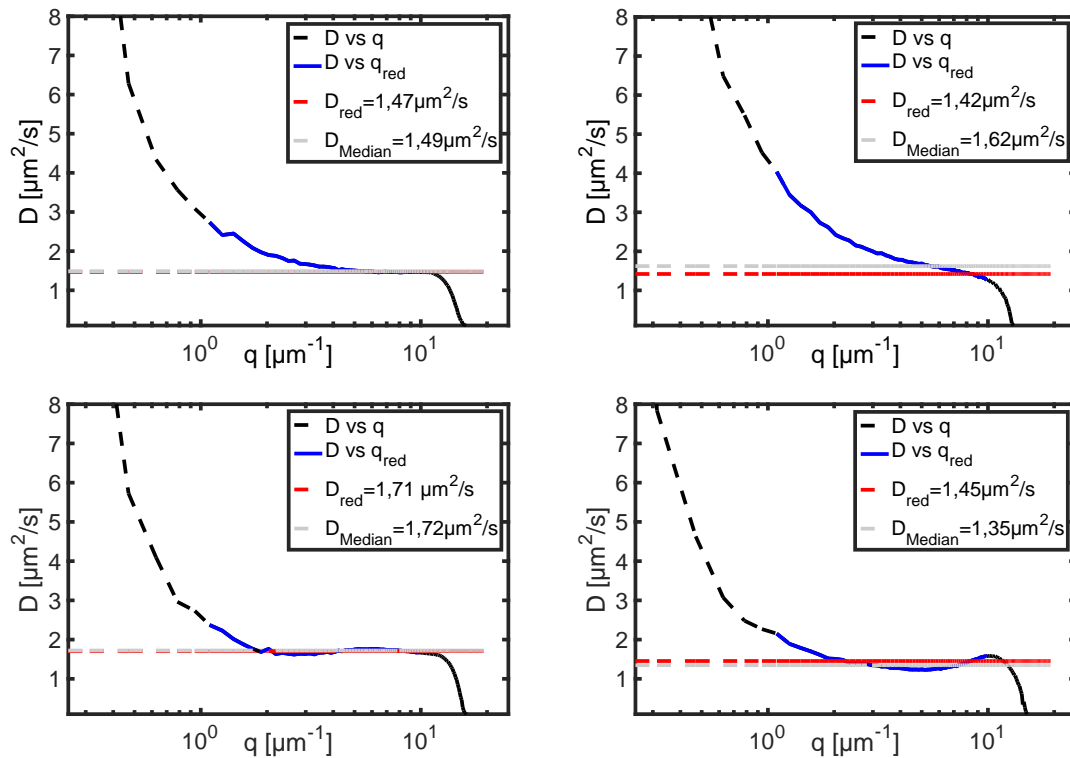
---

---

## Teil V.

# Appendix

## A. Beispielkurven



**Abb. A.1: Exemplarische Ergebnisse für  $D(q)$  aus DDM-Messungen an Beads**

Gezeigt sind unterschiedliche, nach der in Unterkap. 6.3 beschriebenen Prozedur ausgewertete Kurven experimenteller Daten der wellenvektorabhängigen Diffusionskoeffizienten  $D(q)$ . Neben dem aus den Simulationen bestätigten Verhalten einer Überschätzung des Diffusionskoeffizienten für kleine Wellenvektoren zeigt sich bisweilen eine unterschiedliche Steigung des Anstiegs für Bereiche mittlerer Wellenvektoren mit einem gelegentlichem Abfall der Diffusionskoeffizienten, welcher durch Simulationen nicht erklärt werden kann.

## B. Erläuterungen zur Kontrollsoftware

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit entstandenen Ansteuerungen der beiden vorgestellten Aufbauten vorgestellt und die einzelnen Elemente der Ansteuerung erklärt. Die Programme wurden vom Verfasser dieser Arbeit erstellt und zur Aufnahme der in dieser Arbeit vorgestellten Messungen verwendet.

### SPIM-Aufbau

#### Kontrollsoftware zur Aufbauansteuerung und Durchführung von Langzeitaufnahmen

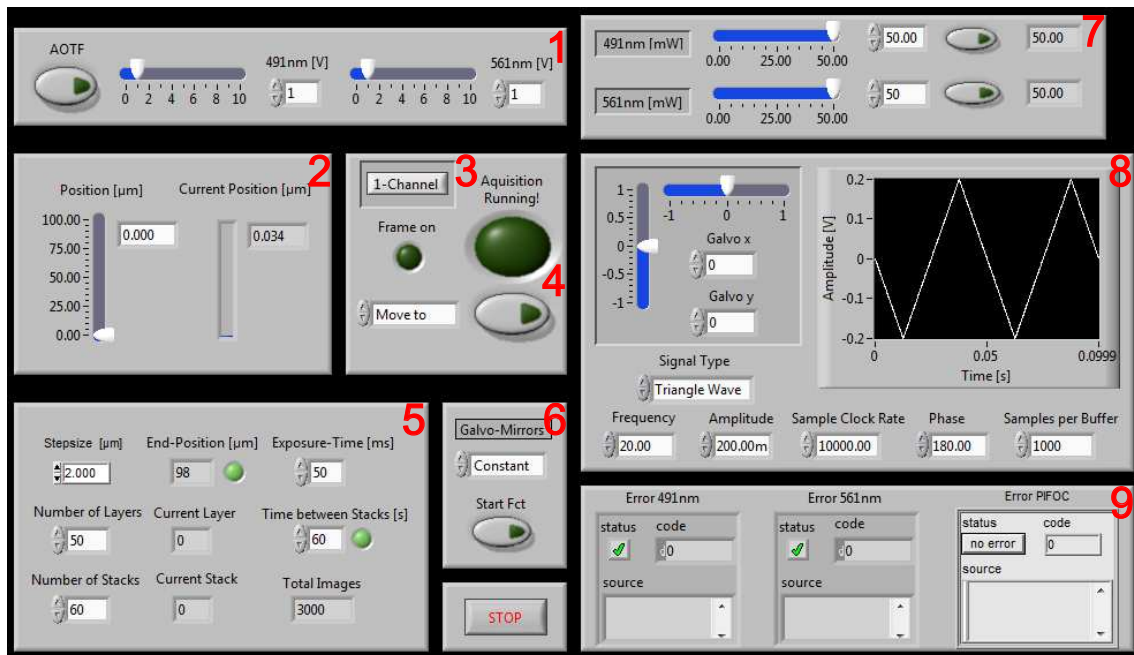


Abb. B.1: LabVIEW-Kontrollsoftware des SPIM-Aufbaus

Die Oberfläche zur Ansteuerung des SPIM-Aufbaus verteilt sich auf 9 unterschiedliche Bereiche der Parametereingabe und -anzeige. Eine Erklärung der einzelnen Bereiche und Parameter erfolgt im Fließtext.

#### Erläuterungen der Eingabeparameter und Anzeigen:

##### 1. AOTF-Transmission (491nm / 561nm):

Die Anpassung der AOTF-Transmission erfolgt durch die Variation der Stärke der angelegten Modulationsspannung (0–10V). Hierdurch wird die Intensität der durch den AOTF erzeugten ersten Mode der beiden Anregungslaser reguliert. Die linke Taste schaltet hierbei durch das Anlegen einer Spannung von 0V (aus) oder 10V (an) am *Blanking*-Eingang des AOTF die Modulation über den AOTF und damit auch die Erzeugung der ersten Mode an bzw. aus. Bei einer getriggerten Stack-Aufnahme wird das *Blanking*-Signal am AOTF automatisch während der Kamerabelichtung auf 10V bzw. zwischen den Aufnahmen auf 0V geschaltet.

##### 2. Positionskontrolle und -anzeige (Position / Current Position):

Über ein iteratives Auslesen der Positionskontrolle des PIFOC wird dessen aktuelle Position (0–100μm) ausgelesen und als *Current Position* angegeben. Das Eingabefeld *Position*

wird für die Befehle *Move to* als zu erreichende Zielposition und in Stackaufnahmen als Startposition der Schichtaufnahme verwendet.

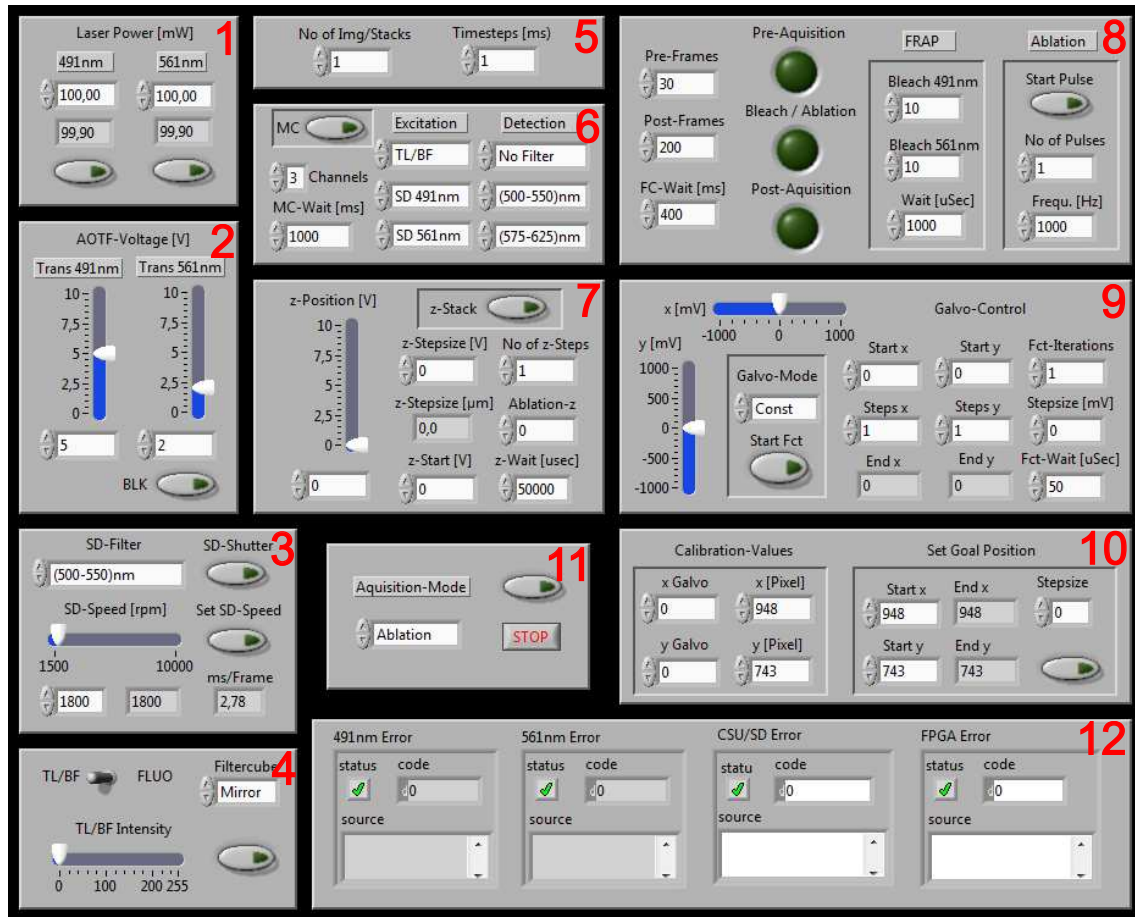
3. **Auswahl von Mehrkanalmessungen (1-Channel / 2-Channel):**  
Die Betätigung dieser Schaltfläche schaltet das Messprogramm für getriggerte Aufnahmen zwischen 1-Kanal und 2-Kanal-Messungen um. Bei 2-Kanal-Messungen wird zuerst der 491nm-Kanal aufgenommen.
4. **Aktionsfeld (Move to Position / Move one Step / Test Stack / Aquisition [Ext. Trigger]):**  
Über das Aktionsauswahlfeld wird der PIFOC entweder zur angegebenen Position in *Position* bewegt, um einen Schritt gemäß der eingestellten *Stepsize* verschoben, eine einzelne Schichtaufnahme gemäß der Einstellungen in *Position*, *Stepsize* und *Number of Layers* abgefahren oder eine komplette getriggerte Langzeitaufnahme durchgeführt. Bei letzterem muss vorher eine getriggerte Kameraaufnahme in der *HoKaWo*-Kamerasoftware vorbereitet werden und die Dauer der Belichtungszeit in dem Eingabefeld *Exposure-Time* angepasst werden. Die Langzeitaufnahme folgt den in *Position*, *Stepsize*, *Number of Layers*, *Number of Stacks* und *time between stacks* eingegeben Parametern. Die ausgewählte Aktion muss über Betätigung der zugehörigen Taste initiiert werden. Unter *Aquisition Running!* wird eine laufende Langzeitaufnahme über ihre Dauer hinweg angezeigt. *Frame on* zeigt die aktuelle Belichtung einer Einzelaufnahme an.
5. **Stack-Ein- und Ausgabeparamter (Stepsize / Number of Layers / Number of Stacks / Exposure-Time / time between stacks / End-Position / Current Layer / Current Stack / Total Images):**  
Hier werden die Schrittweiten, Schichtanzahl, Stackanzahl, Kamerabelichtungszeit und Wartezeiten zwischen Schichtaufnahmen für getriggerte Langzeitmessungen eingegeben. Zusätzliche Anzeigen geben die Endposition, die im Laufe einer Langzeitmessung derzeitige Schicht- und Stackaufnahme, sowie die Gesamtzahl der zu tätigen Bilder für die gewählten Einstellungen an. Zudem weisen zwei Anzeigen auf zu große Endpositionen oder zu kurze Zeiten zwischen zwei Stack-Aufnahmen hin.
6. **Einstellungen des Galvospiegel-Betriebsmodus (Constant / Function / Start Fct):**  
Der Betriebsmodus der Galvospiegel kann zwischen einer konstanten Position der Spiegel (entsprechend der Spannungswerte in *Galvo-x* und *Galvo-y*) und einer dynamischen Positionsveränderung durch eine Spannungskurve gemäß einer eingestellten Funktion gewechselt werden. Bei der Wahl einer Spannungsfunktion muss diese erst über die Taste *Start Fct* gestartet werden. Zur Schonung der Galvospiegel sollte dies nur während einer Aufnahme geschehen.
7. **Laseransteuerung (491nm / 561nm):**  
Die Ausgangsleistung der beiden Laser kann im zur Verfügung stehenden Bereich (1 – 50mW) variiert werden und wird während des Betriebs wiederholt ausgelesen. Für eine stabile Laserleistung wird empfohlen die Laser auf der Leistung 50mW zu betreiben und eine notwendige Anpassung der Anregungsintensität über den AOTF zu realisieren.
8. **Eingabeparameter der Galvospiegelansteuerung (Galvo-x / Galvo-y / Signal Type / Frequency / Amplitude / Phase / Sample Clock Rate / Samples per Buffer):**  
Über die Eingabeparameter kann die Position der Galvospiegel im Betriebsmodus *Constant* über die Spannungswerte *Galvo-x* und *Galvo-y* gesteuert werden. Im Betriebsmodus *Function* wird die Galvospiegelansteuerung der y-Komponente zum Schreiben des Lichtblatts in der Detektionsebene über eine Spannungskurve gesteuert. Neben der Art der erstellten Funktion (*Sine* / *Square* / *Triangle* / *Sawtooth*) können zudem die Parameter

der Frequenz, Amplitude und Phase, sowie die Parameter der *LabVIEW*-internen Spannungskurvenerzeugung (*Sample Clock Rate / Samples per Buffer*) gewählt werden. Insbesondere muss die Frequenz der erzeugten Kurve auf die Kamerabelichtung der Aufnahme angestimmt werden, um eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probenebene während der Aufnahme zu gewährleisten. Die erzeugte Spannungskurve wird hierfür zur Kontrolle in einem Diagramm dargestellt.

9. **Fehlermeldungen** (*Error 491nm / Error 561nm / Error PIFOC*):  
Fehlermeldungen der einzelnen Komponenten während des Betriebs führen zum Abbruch der Software und einer entsprechenden Ausgabe mit Fehlercode.

## SD-FRAP-Ablations-Aufbau

Kontrollsoftware zur Aufbauansteuerung und Durchführung von Langzeitaufnahmen, FRAP- und Ablationsmessungen



**Abb. B.2: LabVIEW-Kontrollsoftware des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus**

Die Oberfläche zur Ansteuerung des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus verteilt sich auf 12 unterschiedliche Bereiche der Parametereingabe und -anzeige. Eine Erklärung der einzelnen Bereiche und Parameter erfolgt im Fließtext.

### Erläuterungen der Eingabeparameter und Anzeigen:

#### 1. Laseransteuerung (491nm / 561nm):

Die Ausgangsleistung der beiden Laser kann im zur Verfügung stehenden Bereich (1 – 100mW) variiert werden und wird während des Betriebs wiederholt ausgelesen. Für eine stabile Laserleistung wird empfohlen die Laser auf der Leistung 100mW zu betreiben und eine notwendige Anpassung der Anregungsintensität über den AOTF zu realisieren.

#### 2. AOTF-Transmission (491nm / 561nm):

Die Anpassung der AOTF-Transmission erfolgt durch die Variation der Stärke der angelegten Modulationsspannung (0–10V). Hierdurch wird die Intensität der durch den AOTF erzeugten ersten Mode der beiden Anregungslaser reguliert. Die linke Taste schaltet hierbei durch das Anlegen einer Spannung von 0V (aus) oder 10V (an) am *Blanking*-Eingang des AOTF die Modulation über den AOTF und damit auch die Erzeugung der ersten Mode an bzw. aus. Bei einer getriggerten Stack-Aufnahme wird das *Blanking*-Signal am AOTF



automatisch während der Kamerabelichtung auf 10V bzw. zwischen den Aufnahmen auf 0V geschaltet.

3. **Spinning-Disk-Ansteuerung** (*SD-Filter / SD-Shutter / SD-Speed*):  
Über eine serielle Kommunikation mit dem Controller der CSU-X1-Einheit können die in der Spinning-Disk verwendeten Detektionsfilter (*No Filter / 430 – 470nm / 500 – 550nm / 575 – 625nm*), der Shutter zur Blockierung des Anregungslichts und die Geschwindigkeit der Nipkow-Scheiben (1800 – 10000rpm) ausgewählt werden. Für letztere wird zusätzlich die benötigte Zeit einer Einzelaufnahme bei der gewählten Geschwindigkeit für die Synchronisierung der Kamerabelichtungszeit angegeben.
4. **Ansteuerung des Mikroskopstativs** (*Mode / Filtercube / TL/BF-Intensity*):  
Über eine serielle Kommunikation mit dem Mikroskopstativ des DMI4000B kann die Beleuchtungsart zwischen *TL/BF* (Durchlicht/Hellfeld) und *FLUO* (Fluoreszenzlampe und Spinning-Disk) gewählt werden. Für den Modus *TL/BF* lässt sich die Intensität der Hellfeldlampe zwischen 0 – 255 variieren. Für den Modus *FLUO* lässt sich der in den Strahlengang eingeklappte Filterwürfel (*L5 / TX2 / Empty / Dichroic / Mirror*) auswählen. In getriggerten Messaufnahmen wird der jeweilig passende Filterwürfel automatisch nach gewähltem Kanal eingeklappt.
5. **Bildanzahl und Zeitabstand** (*No. of Img/Stacks / Timesteps*):  
Bei der gewählten Option zur Aufnahme von Schichtaufnahmen geben die Parameter die Anzahl an Stacks und den Zeitabstand zwischen den jeweils ersten Schichtaufnahmen eines Stacks an, bei der Aufnahme von Einzelbildern die Anzahl an Aufnahmen und den Zeitabstand des jeweiligen Aufnahmebeginns. Es muss darauf geachtet werden einen Zeitabstand zu wählen, der länger ist als die Aufnahmedauer der Einzelaufnahme bzw. der Stackaufnahme.
6. **Mehrkanalmessungen** (*MC / Channels / Excitation / Detection / MC-Wait-Time*):  
Die Auswahl und Parameterübergabe für Mehrkanalmessung beinhaltet in der derzeitigen Implementierung die Aufnahme von bis zu 3 Kanälen. Für die einzelnen Kanäle muss die Anregungsquelle (*TL/BF / SD 491nm / SD 561nm*) und der jeweilig verwendete Filter (*No Filter / 430 – 470nm / 500 – 550nm / 575 – 625nm*) in der SD-Einheit angegeben werden. Als Wartezeit des Messprogramms zwischen einem Wechsel der Kanäle wird nach Rücksprache mit dem Mikroskophersteller 1000ms für einen Wechsel zwischen *TL/BF* und *FLUO* sowie 400ms für eine reine *FLUO*-Aufnahme empfohlen.
7. **z-Positionskontrolle und Parameter einer Schichtaufnahme** (*z-Position / z-Stepsize / z-Start / No of z-Steps / Ablation-z / z-Wait-Time*):  
Neben der Positionsansteuerung des z-Mikroskoptisches erfolgt hier die Wahl zur Aufnahme von Schichtaufnahmen in getriggerten Messungen, sowie die Parameterübergabe der Schrittweite und -anzahl, des Stack-Beginns und der Wartezeit der Positionsansteuerung (empfohlener Wert: 50ms). Bei der Durchführung von Ablationsmessungen lassen sich hier zudem die Position der Probe während des Ablationsvorganges angeben.
8. **FRAP- und Ablationsparameter** (*Pre-Frames / Post-Frames / Filtercube-Wait / Bleach 491nm / Bleach 561nm / Wait / Start Pulse / No of Pulses / Frequ.*):  
Neben der Angabe der Anzahl an *Pre*- und *Post*-Aufnahmen, sowie der Wartezeit des Filterwürfelwechsels bei FRAP- und Ablationsmessungen werden hier die Bleichintensitäten und -dauer in Form der an den AOTF angelegten Spannung eingegeben. Für Ablationsmessungen wird die Pulsanzahl und -frequenz angegeben. Des weiteren kann ein

Triggersignal an den UV-Laser für manuelle Pulsabgaben abgegeben werden. Während einer getriggerten Aufnahme zeigen Hinweisleuchten den Abschnitt der Messung an.

9. **Galvospiegelansteuerung** (*x/y / Galvo-Mode / Start Fct / Start x/y / Steps x/y / End x/y / Fct-Iterations / Stepsize / Fct-Wait*):

Die Auslenkung des Galvospiegelpaares wird über die an deren Controller angelegte Spannung gesteuert. Für manuelles Verfahren sowie für die Verwendung von Einzelfoki und Mehrfokiabfolgen in FRAP und Ablationsmessungen in getriggerten Aufnahmen kann der Modus der Galvospiegelansteuerung zwischen dem Anlegen einer konstanten Spannung entsprechend der in *x/y* angegebenen Werte (Modus *Const.*) oder einer Spannungsabfolge gemäß der angegebenen Parameter (*Function*) gewechselt werden. Die Parameter beinhalten Startposition und Schrittweite in Spannungswerten, die Iterationsanzahl des Abfahrens der Funktion und die Wartezeit zwischen den einzelnen Galvospiegelpositionen (empfohlen: 50µs). Für ein manuelles Starten der ausgewählten Spannungsabfolge dient der Schalter *Start Fct*.

10. **Galvospiegelkalibration** (*x-/y-Galvo / x/y / Start x/y / End x/y / Stepsize*):

Zur schnellen Überprüfung oder Neukalibration der Fokusposition in FRAP- und Ablationsmessungen kann für eine beliebige Galvospiegelposition ein Testfokus über die Verwendung eines Chromaslides oder dem Einbrennen einer Mikrolinse erzeugt werden und die Position in Pixelkoordinaten zusammen mit den Werten der angelegten Spannung angegeben werden. Dies wird für die Berechnung der gewünschten eingegebenen Fokuspositionen und Schrittweite in Pixelkoordinaten verwendet und überschreibt die entsprechenden Parameter in der Galvospiegelansteuerung. Die Zuweisung der Pixelkoordinaten ist in der jetzigen Implementierung nur für eine Kameraaufnahme ohne Binning korrekt.

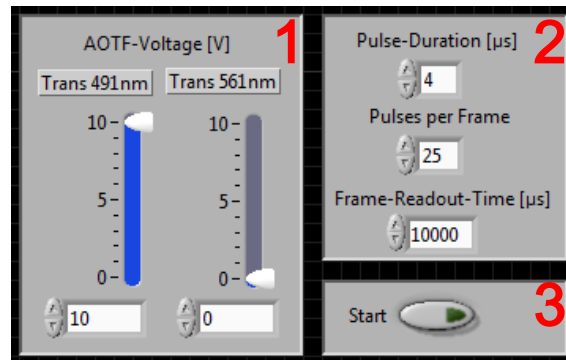
11. **Aufnahmemodus** (*Imaging / FRAP / Ablation*):

Der Aufnahmemodus für getriggerte Messung lässt sich zwischen Langzeitaufnahmen, FRAP- und Ablationsmessungen wählen. Durch Betätigung des Start-Knopfes wird die Aufnahme-prozedur des jeweiligen Messtyps unter Synchronisation der Kameraansteuerung zur getriggerten Bildaufnahme abgelaufen. Für FRAP-Messungen stehen in der derzeitigen Implementierung keine Mehrkanalmessungen oder Schichtaufnahmen zur Verfügung. Die Messungen erfolgen unter den nachfolgend beschriebenen Parametern der Aufnahmen.

12. **Fehlermeldungen** (*491nm Error / 561nm Error / CSU/SD Error / FPGA Error*):

Fehlermeldungen der einzelnen Komponenten während des Betriebs führen zum Abbruch der Software und einer entsprechenden Ausgabe mit Fehlercode.

### ISM-Software zur Durchführung von Stroboskopaufnahmen



**Abb. B.3: LabVIEW-Kontrollsoftware für Stroboskopaufnahmen**

Die Oberfläche des Messprogramms zur Erstellung von Stroboskopaufnahmen besteht aus 3 unterschiedlichen Bereichen der Parameterübergabe. Eine Erklärung der Bereiche und Parameter erfolgt im Fließtext.

1. **AOTF-Transmission** (*491nm / 561nm*):

Die Anpassung der AOTF-Transmission erfolgt durch die Variation der Stärke der angelegten Modulationsspannung (0 – 10V). Hierdurch wird die Intensität der durch den AOTF erzeugten ersten Mode der beiden Anregungslaser während der ISM-Aufnahme reguliert.

2. **ISM-Parameter** (*Pulse-Duration / Pulses per Frame / Frame-Readout.Time*):

Zur Erstellung einer Stroboskopaufnahme wird ein Lichtpuls mit einer Länge entsprechend der Pulsdauer zur Anregung der Probe verwendet. Eine Erhöhung der Pulsanzahl führt zu einer Integration der Bildaufnahme über mehrere Anregungsereignisse zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und einer Verlängerung der Messdauer. Die Auslesezeit der einzelnen Kameraaufnahmen sollte bei voller Bildgröße mindestens 20ms betragen.

3. **Start der Stroboskopaufnahme** (*Start*):

Nach der Vorbereitung einer Stream-Aufnahme innerhalb der Kamerasoftware kann die Messung über die Betätigung des Schalters gestartet werden.

## **C. Verwendete Bauteile in den Aufbauten**

Im Nachfolgenden werden die einzelnen Komponenten der in dieser Arbeit weiterentwickelten und entstandenen Aufbauten in Form von Tabellen gelistet. Zudem werden die für den SPIM-Aufbau verwendeten Linsenkombinationen und die Laserleistungen an unterschiedlichen Orten des Strahlenganges der Aufbauten in Form einer Tabelle angegeben.

## C VERWENDETE BAUTEILE IN DEN AUFBAUTEN

### Bauteile des SPIM-Aufbaus

Gruppe	Beschreibung	Anzahl	Typ	Hersteller
<b>Optischer Tisch</b>	Optischer Tisch	1	OTTR-203-1219-1829-M6	CVI Melles Griot
	Gedämpfte Füße	4	07 OTI 055	CVI Melles Griot
	Breadboard	1	MB3030/M	Thorlabs
	Breadboard-Halter	2	VB01/M	Thorlabs
<b>Beleuchtung</b>	Anregungslaser 1	1	Cobolt Calypso 491 nm DPSS laser, 50mW , Modell 04-01	Cobolt
	Anregungslaser 2	1	Cobolt Jive 561 nm DPSS laser, 50mW , Modell 04-01	Cobolt
	Kühlplatte	2	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Shutter / Intensitätsmodulierung	1	AOTFnc-400.650-TN + MDS-Controller	AA Opto-Electronic
	Adapterplatte + Kühlplatte + Stromversorgung	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Auflichtquelle	1	JANSJÖ	INGKA Holding B.V
<b>Optomechaniken</b>	Schienen	1	S65-130-LL	Owis
	Schienen	1	S65-200-LL	Owis
	Schienen	5	S65-300-LL	Owis
	Schienen	1	S65-400-LL	Owis
	Reiter	9	RT 65-40-R-LL	Owis
	Reiter	6	RT 65-20-R	Owis
	Spiegelhalter	8	K 50-FGS + SF-D26-D40	Owis
	Linsenhalter	5	KM100	Thorlabs
	Adapterplatte	5	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Zylinderlinsenhalter	1	KM100C	Thorlabs
	Adapterplatte	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Filterrad	1	FW2A Filter Wheel Station	Thorlabs
	Adapterplatte	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Optiken</b>	Spiegel	8	BB1-E02	Thorlabs
	Tubulinse	1	AC508-200-A	Thorlabs
	L1	1	AC254-50-A	Thorlabs
	L2	1	AC254-150-A	Thorlabs
	L3	1	AC254-100-A	Thorlabs
	L4	1	AC254-300-A	Thorlabs
	Zylinderlinse	1	LJ1277L1-A (f=250mm)	Thorlabs
	Dichroit	1	DMLP505	Thorlabs
	Detektionsfilter	1	531/46 nm BrightLine® single-band bandpass	Semrock
	Detektionsfilter	1	488 nm EdgeBasic	Semrock
	Detektionsfilter	1	SEM-NF03-561E-25 Notch Filter 561 nm	Semrock
<b>Galvospiegelpaar</b>	xy-Spiegelpaar	1	6210HS + 3mm XY Mirror Set Protected Aluminum Coating	Cambridge Technology
	Controller	1	MicroMax series 671XX ±24 to ±28V, "A" connector.	Cambridge Technology
	Adapterplatte + xy-Linearverschiebetisch + Kühlplatte + Stromversorgung	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Objektive</b>	Anregungsobjektiv	1	HCX APO L 10x/0.30 W U-V-I (WD 3.6 mm)	Leica Microsystems
	Objektivhalter	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Detektionsobjektiv	1	HCX APO L 40x/0.80 W U-V-I (WD 3.3 mm)	Leica Microsystems
	Objektivhalter + Linearverschiebetische	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Probenkammer</b>	Probenkammer	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Temperaturkontrolle	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Hebetisch	1	Swiss Boy 100 + Adapter	Rudolf Grauer
<b>Probenpositionierer</b>	xy-Stage	2	T-LS28M-KT03	Zaber Technologies
	Z-Position, grob	1	Hebetisch	Linios GmbH
	z-Position, fein	1	P-721 PIFO	Physik Instrumente
	Probenhalter + Adapterplatten	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Kamera</b>	sCMOS-Kamera	1	Hamamatsu Orca Flash 4.0, V1 ( + Firmware-Upgrade für Lightsheet-Readout-Mode)	Hamamatsu
	Kamera-Halter	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Ansteuerung</b>	PC	1	CELSIUS W520 + IO-Interface	Fujitsu
	LabVIEW-Karte	1	NI PCIe-6353, X Series Multifunction DAQ + 2x SCB-68A Connector Blocks	National Instruments
	Getriggerte Spannungsquelle	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten

**Tab. 10: Liste der Bauteile des SPIM-Aufbaus**

Aufgeführt sind die in dem in Kap. 4 vorgestellten Aufbau verwendeten Bauteile mit einer kurzen Beschreibung ihrer Funktionen, Produktnamen und Hersteller.

### Verwendete Linsenkombinationen im SPIM-Aufbau

$f_1$ [mm]	$f_2$ [mm]	$f_3$ [mm]	$f_4$ [mm]	$M$	$2 \cdot \sigma_{Strahl}$
-	-	-	-	1	0,7mm
40	100	-	-	2,5	1,75mm
40	150	-	-	3,75	2,63mm
50	150	100	300	9	6,3mm
40	100	50	250	12,5	8,75mm

**Tab. 11: Linsenkombinationen und Strahldurchmesser am Objektiv**

Gelistet sind die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Linsenkombinationen zur Formung des Lichtblattes mit den entsprechenden Brennweiten, effektiven Vergrößerungsfaktoren  $M$  und der daraus resultierenden Größe des Strahldurchmessers.

### Laserleistungen im SPIM-Aufbau

Messort	491nm	561nm
Nach Laser	$(50,5 \pm 0,2)\text{mW}$	$(50,2 \pm 0,3)\text{mW}$
vor AOTF	$(46,3 \pm 0,3)\text{mW}$	$(41,2 \pm 0,3)\text{mW}$
nach AOTF	$(41,9 \pm 0,3)\text{mW}$	$(37,4 \pm 0,3)\text{mW}$
vor Objektiv	$(26,0 \pm 0,2)\text{mW}$	$(20,0 \pm 0,1)\text{mW}$

**Tab. 12: Laserleistungen an unterschiedlichen Stellen im SPIM-Aufbau**

Die Laserleistungen der Anregungslaser wurden an den angegebenen Probenstellen bei voller Laserleistung und maximaler Transmission des AOTF mithilfe einer *PM100D*-Konsole mit einer *S130C*-Photodiode (Thorlabs) gemessen.

# Bauteile des zweiten SPIM-Aufbaus

Gruppe	Beschreibung	Anzahl	Typ	Hersteller
<b>Erster Aufbau</b>				
<b>Optischer Tisch</b>	Optischer Tisch	1	OTTR-203-1219-1829-M6	CVI Melles Griot
	Gedämpfte Füße	4	07 OTI 055	CVI Melles Griot
	Breadboard	1	MB3030/M	Thorlabs
	Breadboard-Halter	2	VB01/M	Thorlabs
<b>Beleuchtung</b>	Anregungslaser 1	1	Cobolt Calypso 491 nm DPSS laser, 50mW , Modell 04-01	Cobolt
	Anregungslaser 2	1	Cobolt Jive 561 nm DPSS laser, 50mW , Modell 04-01	Cobolt
	Kühlplatte	2	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Auflichtquelle	1	JANSJO	INGKA Holding B.V
<b>Optomechaniken</b>	Schienen	3	S65-300-LL	Owis
	Reiter	4	RT 65-40-R-LL	Owis
	Reiter	3	RT 65-20-R	Owis
	Spiegelhalter	4	K 50-FGS + SF-D26-D40	Owis
	Linsenhalter	3	KM100	Thorlabs
	Adapterplatte	3	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Optiken</b>	Spiegel	4	BB1-E02	Thorlabs
	L1	1	AC254-50-A	Thorlabs
	L2	1	AC254-150-A	Thorlabs
	Dichroit	1	DMLP505	Thorlabs
<b>Neue Komponenten</b>				
<b>Optomechaniken</b>	Schienen	2	S65-130-LL	Owis
	Schienen	1	S65-300-LL	Owis
	Schienen	1	S65-400-LL	Owis
	Reiter	2	RT 65-40-R-LL	Owis
	Reiter	7	RT 65-20-R	Owis
	Spiegelhalter	2	K 50-FGS + SF-D26-D40	Owis
	Linsenhalter	1	OHU 65-D50	Owis
	Linsenhalter	4	KM100	Thorlabs
	Adapterplatte	7	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Zylinderlinsenhalter	1	KM100C	Thorlabs
	Irisblende	1	IB-D54 + OHIB-D54-S65	Owis
<b>Optiken</b>	Spiegel	2	BB1-E02	Thorlabs
	Strahlteiler	1	BSW10	Thorlabs
	Tubuslinse	1	AC508-200-A	Thorlabs
	L5	1	AC254-50-A	Thorlabs
	L6	1	AC254-200-A	Thorlabs
	Zylinderlinse	1	LJ1629L1-A (f=150mm)	Thorlabs
	Detektionsfilter	1	FF01-531/46-25	Semrock
	Detektionsfilter	1	BLP02-561R-25	Semrock
<b>Objektive</b>	Anregungsobjektiv	1	HCX APO L 10x/0.30 W U-V-I (WD 3.6 mm)	Leica Microsystems
	Detektionsobjektiv	1	HCX APO L 40x/0.80 W U-V-I (WD 3.3 mm)	Leica Microsystems
<b>Probenkammer</b>	Probenkammer + Objektivhalter	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Probenpositionierer</b>	xyz-Stage	1	3x MTS50/M-Z8 + 3x TDC001+1x TCH002	Thorlabs
	Probenhalter + Adapterplatten	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Kamera</b>	CCD-Kamera	1	DFC 360 FX	Leica Microsystems
	Kamera-Halter	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Ansteuerung</b>	PC	1	CELSIUS W520 + IO-Interface	Fujitsu

**Tab. 13: Liste der Bauteile des zweiten SPIM-Aufbaus**

Aufgeführt sind die in dem in Unterkap. 4.4 vorgestellten Aufbau verwendeten Bauteile mit einer kurzen Beschreibung Ihrer Funktionen, Produktnamen und Hersteller. Unter dem Abschnitt „Erster Aufbau“ sind die relevanten Bauteile des zuvor vorgestellten SPIM-Aufbaus aufgeführt. „Neue Komponenten“ beinhaltet die neu hinzugekommenen Bauteile für diesen Teil des Versuchsaufbaus.

## C VERWENDETE BAUTEILE IN DEN AUFBAUTEN

### Bauteile des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus

Gruppe	Beschreibung	Anzahl	Typ	Hersteller
<b>Optischer Tisch</b>	Optischer Tisch	1	T1220C - Nexus Optical Table 1.2 m x 2 m x 210 mm	Thorlabs
	Gedämpfte Füße	4	PTH603, 700mm	Thorlabs
	Breadboard	1	MB7575/M	Thorlabs
	Breadboard-Füße	5	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Mikroskop</b>	Mikroskopstativ	1	DMI 4000B	Leica Microsystems
	Steuerbox	1	CTR4000	Leica Microsystems
	Fluoreszenzlampe	1	EL6000	Leica Microsystems
	Filterwürfel	2	L5, TX2	Leica Microsystems
	Filterwürfel (gedreht)	2	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Spiegel (auf gedr. Filterwürfel)	1	MIRROR 4-6 WAVE 22 X 29MM	Edmund Optics
	Dichroit (auf gedr. Filterwürfel)	1	FF376-Di01, Di02-R405-22x29, Di02-R561-22x29	Semrock
	Adapterplatte + Montierwinkel	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Probenpositionierer</b>	xy-Linearverschiebetisch	1	SCAN IM 130 x 85 - 2 mm + TANGO 2 Desktop	Märzhäuser Wetzlar
	Z-Positionierung	1	Super Z (250µm Verfahrenweg)	Leica Microsystems
<b>Spinning-Disk</b>	Spinning-Disk	1	CSU-X1-A1-5000rpm + Multiband Filterset 405/488/568/647 nm	Yokogawa
	Detektionsfilter	3	(430-470)nm, (500-550)nm, (575-625)nm	Visitron
	Kameraport-Anschluss	1	Spectral 1530 (Vergrößerung 1,53)	Leica Microsystems
<b>Objektive</b>	Öl-Immersionsobjektiv	1	HCX PL APO 63x/1.40-0.60 OIL CS	Leica Microsystems
	Wasser-Immersionsobjektiv	1	HCX PL APO 63x/1.20 W CORR CS2	Leica Microsystems
	10x Luftobjektiv	1	N Plan 10x/0,25 PH 1	Leica Microsystems
<b>Kamera</b>	sCMOS-Kamera	1	Hamamatsu Orca Flash 4.0, V1	Hamamatsu
<b>Laser</b>	Lasergehäuse	1	Dual Combiner	Cobolt
	Anregungslaser 1	1	Cobolt Calypso 491 nm DPSS laser, 100mW	Cobolt
	Anregungslaser 2	1	Cobolt Jive 561 nm DPSS laser, 100mW	Cobolt
	Kühlplatte	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Ablations-Laser	1	6FTSS355-Q3-STA (355nm > 15 µJ @ 1 kHz) + 6OPTSYNCH + 6OPTSWITCH ELECTR. + 6OPTBURST-Q + 6OPTATTENUAT.MAN	Crylas
	Kühlplatte	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Shutter / Intensitätsmodulierung	1	AOTFnc-400.650-TN + MDS-Controller	AA Opto-Electronic
	Adapterplatte + Kühlplatte + Stromversorgung	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Optomechaniken</b>	Schienen	2	S65-200-LL	Owis
	Schienen	3	S65-300-LL	Owis
	Schienen	2	S65-400-LL	Owis
	Reiter	11	RT 65-40-R-LL	Owis
	Reiter	9	RT 65-20-R	Owis
	Spiegelhalter	10	K 50-FGS + SF-D26-D40	Owis
	Klappspiegelhalter	1	KSHM 40-RE-MDS + ADP 65B	Owis
	Linsenhalter	2	OHU 65-D50	Owis
	Linsenhalter	5	KM100	Thorlabs
	Adapterplatte	5	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Pinhole (50µm)	1	LB 50-D5-G25 + OH 40-D25	Owis
	Fasereinkopplung	1	60SMS-1-4-M8-33 f8,1 mm / NA 0,17, FC-APC	Schäfter+Kirchhoff
	Adapterplatte	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Optiken</b>	Spiegel	6	BB1-E01	Thorlabs
	Spiegel	5	BB1-E02	Thorlabs
	L1	1	AC254-50-A	Thorlabs
	L2	1	AC254-150-A	Thorlabs
	L UV,1	1	LA4052-A (f=35mm)	Thorlabs
	L UV,2	1	LA4102-A (f=200mm)	Thorlabs
	L3	1	LB1309-A (f=75mm)	Thorlabs
	L4	1	LB1917-A (f=300mm)	Thorlabs
	50/50 Strahlteiler	1	BSW10	Thorlabs
<b>Galvospiegelpaar</b>	xy-Spiegelpaar	1	6210HSM60 + 5mm XY Mirror Set Protected Al. Coating	Cambridge Technology
	Controller	1	MicroMax series 671XX ±24 to ±28V, "A" connector.	Cambridge Technology
	Adapterplatte + xy-Linearverschiebetisch + Kühlplatte + Stromversorgung	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
<b>Ansteuerung</b>	PC	1	CELSIUS W530 Power + IO-Interface	Fujitsu
	LabVIEW-Karte	1	NI PCIe-7842R Virtex-5 LX50 R Series Multifunction RIO Device + 3x SCB-68A Con. Blocks	National Instruments
<b>Klimakammer 37°C</b>	Klimakammer	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten
	Temperaturkontrolle	1	Eigenbau	Universitätswerkstätten

**Tab. 14: Liste der Bauteile des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus**

Aufgeführt sind die in dem in Kap. 8 vorgestellten Aufbau verwendeten Bauteile mit einer kurzen Beschreibung ihrer Funktionen, Produktnamen und Hersteller.



### Laserleistungen im SD-FRAP-Ablations-Aufbau

Messort	491nm	561nm
Breadboard		
Nach Laser	$(92,5 \pm 0,5)\text{mW}$	$(104,5 \pm 0,3)\text{mW}$
vor AOTF	$(85,8 \pm 0,3)\text{mW}$	$(96,0 \pm 0,2)\text{mW}$
nach AOTF	$(83,0 \pm 0,3)\text{mW}$	$(88,4 \pm 0,3)\text{mW}$
Spinning Disk		
vor Faser	$(48,0 \pm 0,2)\text{mW}$	$(51,3 \pm 0,3)\text{mW}$
nach Faser	$(19,2 \pm 0,4)\text{mW}$	$(17,6 \pm 0,5)\text{mW}$
vor Objektiv	$(2,25 \pm 0,05)\text{mW}$	$(2,00 \pm 0,06)\text{mW}$
FRAP		
nach Strahlteiler	$(30,0 \pm 0,3)\text{mW}$	$(36,6 \pm 0,4)\text{mW}$
vor Objektiv	$(17,8 \pm 0,3)\text{mW}$	$(21,8 \pm 0,2)\text{mW}$

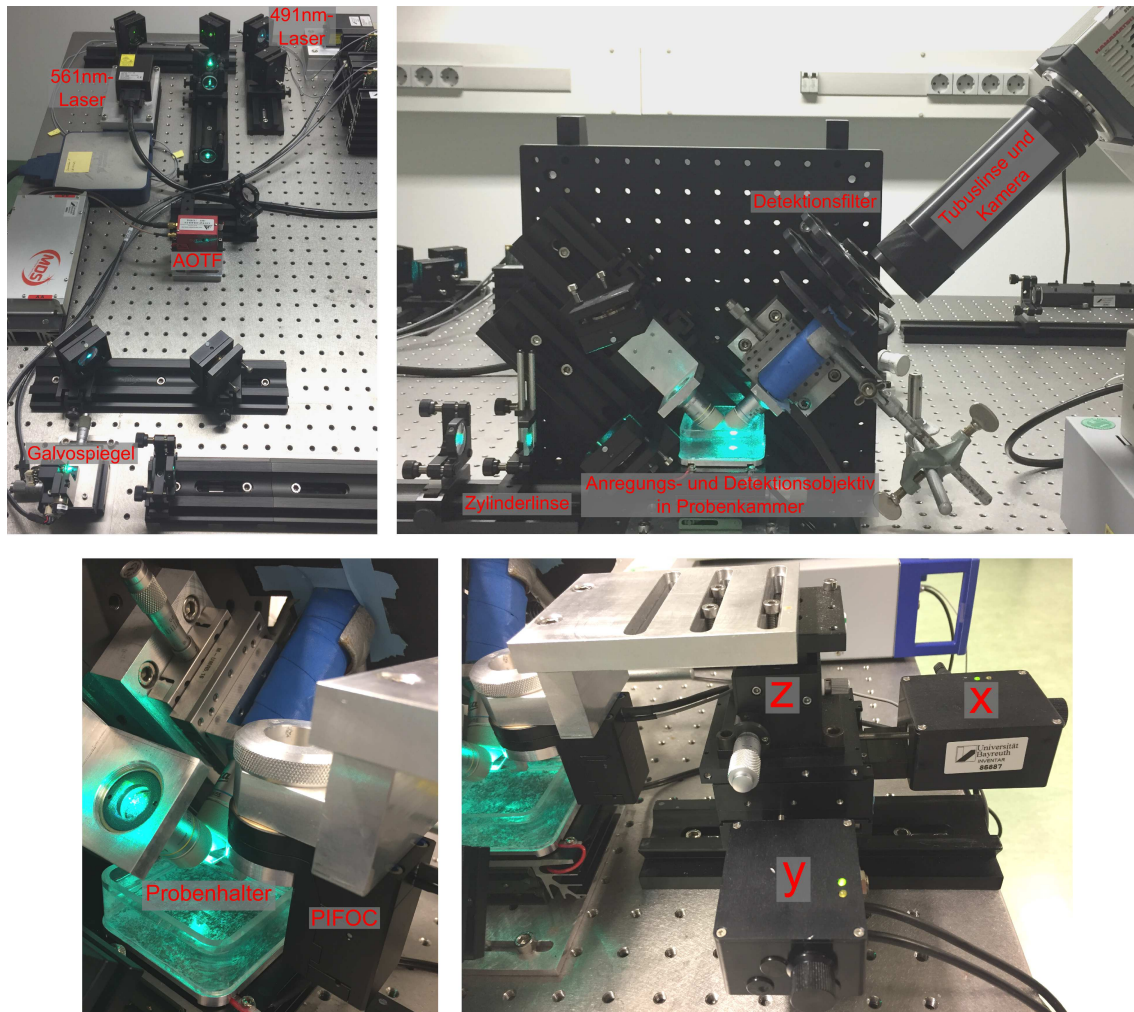
**Tab. 15: Laserleistungen an unterschiedlichen Stellen im SD-FRAP-Ablations-Aufbau**

Die Laserleistungen der Anregungslaser wurden an den angegeben Probenstellen bei voller Laserleistung und maximaler Transmission des AOTF mithilfe einer *PM100D*-Konsole mit einer *S130C*-Photodiode (Thorlabs) gemessen. Die Anregungsleistungen für Bildaufnahmen mittels der Spinning-Disk-Einheit und für FRAP-Experimente sind getrennt dargestellt.

## D. Bilder der Aufbauten

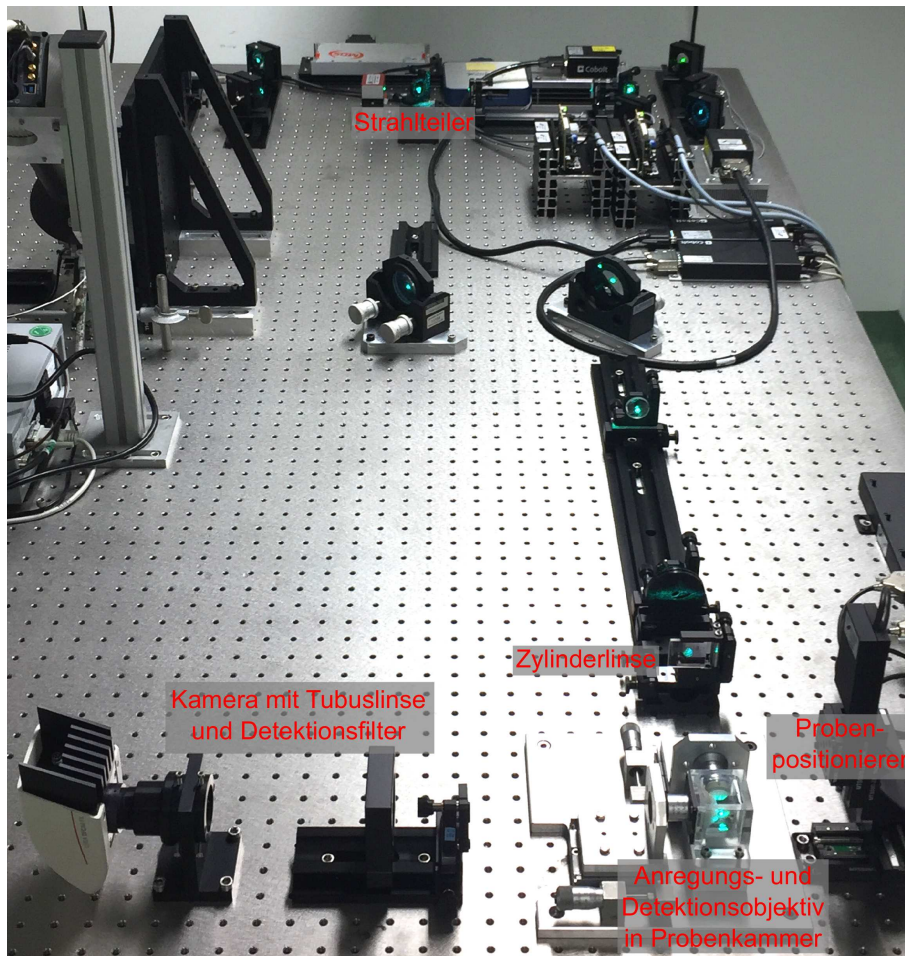
Nachfolgend sind Bilder der in dieser Arbeit vorgestellten Aufbauten gezeigt. Die wichtigsten Bauteile sind hierbei in den Abbildungen beschriftet. Für eine Skizze der Strahlengänge in den Aufbauten wird auf die entsprechenden Abbildungen in den Unterkapiteln 4 und 8 verwiesen.

### SPIM-Aufbauten



**Abb. D.1: Bilder des SPIM-Aufbaus**

Gezeigt sind Bilder des Beleuchtungstrahlengangs, des Breadboard-Aufbaus mit dem Detektionsstrahlengang und der Probenpositionierungseinheit. Der Strahlengang des Aufbaus ist in Abb. 4.1 skizziert.

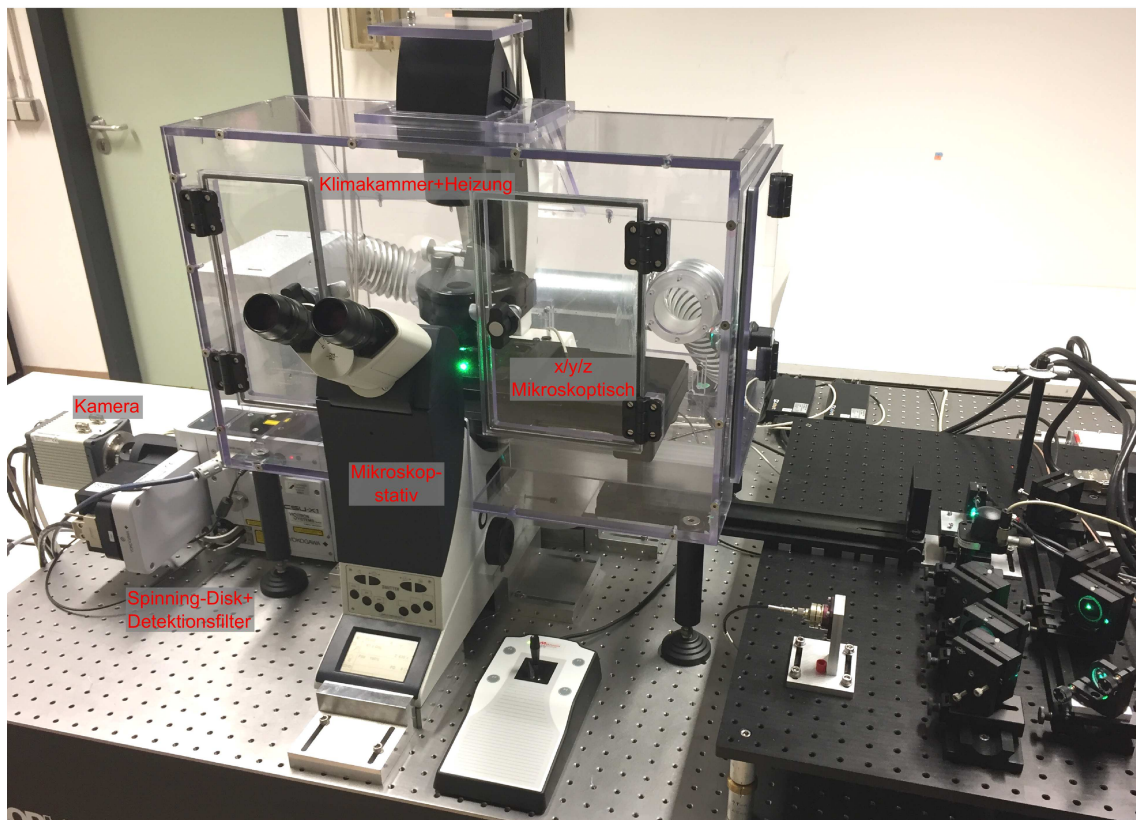
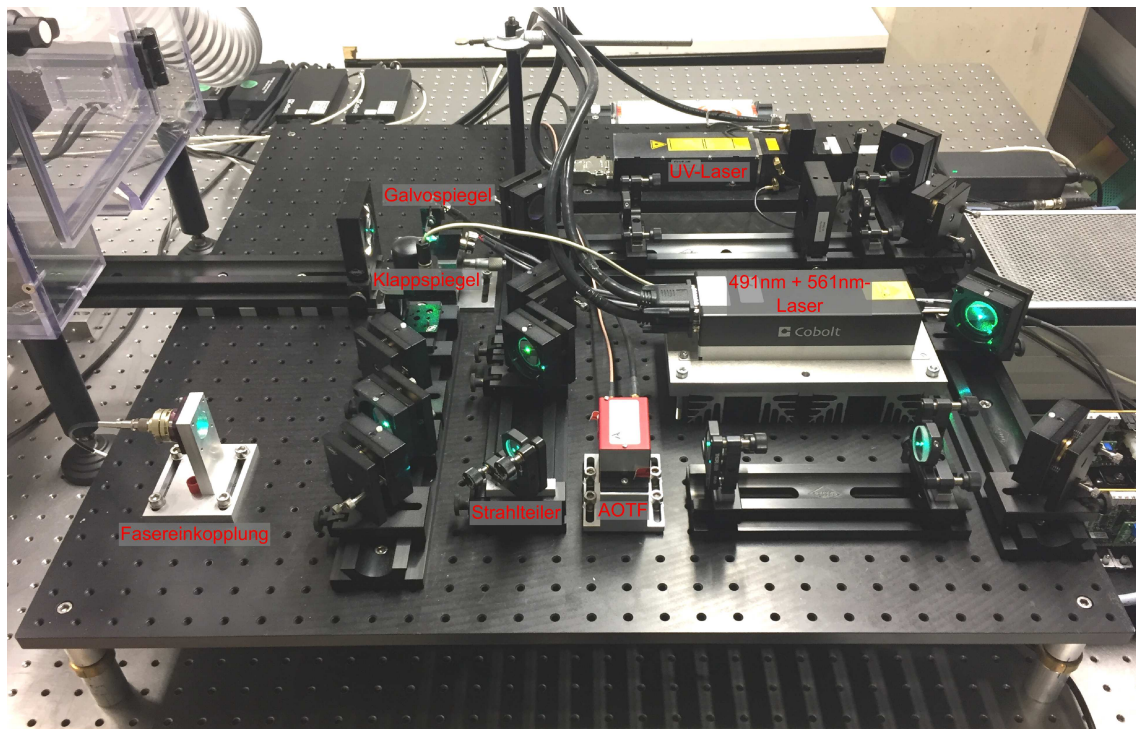


**Abb. D.2: Bilder des zweiten SPIM-Aufbaus**

Gezeigt ist der Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang des zweiten SPIM-Aufbaus. Zur besseren Darstellung wurde zur Bildaufnahme der Streulichtschutz im Detektionsstrahlengang entfernt. Der Strahlengang des Aufbaus ist in Abb. 4.4 skizziert.



### SD-FRAP-Ablations-Aufbau



**Abb. D.3: Bilder des SD-FRAP-Ablations-Aufbaus**

Gezeigt sind Bilder des Beleuchtungstrahlengangs sowie des Mikroskopstativs mit der Spinning-Disk-Einheit, der Kamera und der Klimakammer. Der Strahlengang des Aufbaus ist in Abb. 8.1 und 8.2 skizziert.

## Literatur

- [1] Randall Munroe. *What if? : serious scientific answers to absurd hypothetical questions*. 2014.
- [2] Eva Bianconi, Allison Piovesan, Federica Facchin, Alina Beraudi, Raffaella Casadei, Flavia Frabetti, Lorenza Vitale, Maria Chiara Pelleri, Simone Tassani, Francesco Piva, Soledad Perez-Amodio, Pierluigi Strippoli, and Silvia Canaider. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6):463–471, nov 2013.
- [3] Aristoteles. *De generatione animalium*.
- [4] Joseph Needham and Arthur Hughes. *A history of embryology*. Cambridge University Press, 2015.
- [5] Ilse Jahn. *Geschichte der Biologie : Theorien, Methoden, Institutionen, Kurzbiografien*. Nikol, 2004.
- [6] A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1-2):153–197, 1952.
- [7] Osamu Shimomura, Frank H. Johnson, and Yo Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 59(165):223–239, 1962.
- [8] M Chalfie, Y Tu, G Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5148):802–5, 1994.
- [9] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell 6e*, volume 6. 2014.
- [10] I. Zaldua, J. J. Equisoain, A. Zabalza, E. M. Gonzalez, and A. Marzo. Image: Animal cell Public via Wikimedia Commons, University of Navarre.
- [11] S. Brenner. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1):71–94, 1974.
- [12] WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.7.1.
- [13] J.E. Sulston, E. Schierenberg, J.G. White, and J.N. Thomson. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1):64–119, nov 1983.
- [14] Lesilee Rose and Pierre Gönczy. Polarity Establishment, Asymmetric Division and Segregation of Fate Determinants in Early *C. Elegans* Embryos. *WormBook*, 2014.
- [15] Einhard Schierenberg. Embryological variation during nematode development. *Worm-Book*, pages 1–13, 2006.
- [16] Rolf Fickentscher, Philipp Struntz, and Matthias Weiss. Mechanical cues in the early embryogenesis of *caenorhabditis elegans*. *Biophysical Journal*, 105(8):1805–1811, 2013.
- [17] Rolf Fickentscher, Philipp Struntz, and Matthias Weiss. Setting the Clock for Fail-Safe Early Embryogenesis. *Physical Review Letters*, 117(18):1–5, 2016.

- [18] C. elegans Sequencing Consortium. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396):2012–2018, 1998.
- [19] Hiroaki Tabara, Alla Grishok, and Craig C. Mello. RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science*, 282:430–431, 1998.
- [20] Julie Ahringer. Reverse genetics. *WormBook*, pages 1–43, 2006.
- [21] Ann K. Corsi, Bruce Wightman, and Martin Chalfie. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2):387–407, 2015.
- [22] Z.F Altun and D.H. Hall. Introduction to *C. elegans* anatomy. *WormAtlas*, 2017.
- [23] Rolf Fickentscher. *Dreidimensionale Rekonstruktion biologischer Proben mittels zeitaufgelöster Lichtblattmikroskopie*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, 2013.
- [24] James W. Golden and Donald L. Riddle. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology*, 102(2):368–378, 1984.
- [25] Pierre Gönczy and Lesilee Rose. Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, pages 1–20, 2005.
- [26] B Goldstein and S N Hird. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 122(5):1467–74, may 1996.
- [27] Geraldine Seydoux and Matthew R. Wallenfang. Polarization of the anterior -posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature*, 408(6808):89–92, nov 2000.
- [28] A A Hyman and J G White. Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 105(5):2123–35, 1987.
- [29] W. B. Wood. Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature*, 349(6309):536–538, feb 1991.
- [30] Christian Pohl and Zhirong Bao. Chiral forces organize left-right patterning in *C. elegans* by uncoupling midline and anteroposterior axis. *Developmental cell*, 19(3):402–12, sep 2010.
- [31] Ortrud Wartlick, Anna Kicheva, and Marcos González-Gaitán. Morphogen gradient formation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(3):1–22, 2009.
- [32] Bob Goldstein and Ian G. Macara. The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Developmental Cell*, 13(5):609–622, nov 2007.
- [33] Brian R. Daniels, Terrence M. Dobrowsky, Edward M. Perkins, Sean X. Sun, and Dennis Wirtz. MEX-5 enrichment in the *C. elegans* early embryo mediated by differential diffusion. *Development*, 137(15):2579–2585, 2010.
- [34] Erik E. Griffin, David J. Odde, and Geraldine Seydoux. Regulation of the MEX-5 Gradient by a Spatially Segregated Kinase/Phosphatase Cycle. *Cell*, 146(6):955–968, sep 2011.
- [35] K J Reese, M a Dunn, J a Waddle, and G Seydoux. Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Molecular cell*, 6(2):445–455, 2000.

- [36] Brian R. Daniels, Edward M. Perkins, Terrence M. Dobrowsky, Sean X. Sun, and Denis Wirtz. Asymmetric enrichment of PIE-1 in the *Caenorhabditis elegans* zygote mediated by binary counterdiffusion. *Journal of Cell Biology*, 184(4):473–479, 2009.
- [37] Zdenek Petrasek, Carsten Hoege, Alireza Mashaghi, Thomas Ohrt, Anthony A. Hyman, and Petra Schwille. Characterization of Protein Dynamics in Asymmetric Cell Division by Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 95(11):5476–5486, 2008.
- [38] Jan Wolfgang Krieger. *Mapping Diffusion Properties in Living Cells*. Phd thesis, Ruperto-Carola Universität Heidelberg, 2014.
- [39] Mohit Kumar, Mario S. Mommer, and Victor Sourjik. Mobility of cytoplasmic, membrane, and DNA-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 98(4):552–559, 2010.
- [40] Robert Brown. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series 2*, 4(21):161–173, 1828.
- [41] Albert Einstein. Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden füssigkeiten suspendierten teilchen. *Annalen der Physik*, 1905.
- [42] M. von Smoluchowski. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik*, 326(14):756–780, 1906.
- [43] Paul Langevin. Sur la théorie du mouvement brownien. *CR Acad. Sci.*, 146:530–533, 1908.
- [44] Jean Perrin. Mouvement brownien et réalité moléculaire. *Annales de Chimie et de Physique*, 18:5–104, 1909.
- [45] P. Walters. *An introduction to ergodic theory*. Springer, 1982.
- [46] F. Schwabl. *Statistische Mechanik*. Springer, 3rd edition, 2006.
- [47] T. Fließbach. *Statistische Physik: Lehrbuch zur Theoretischen Physik IV*. Springer, 5th edition, 2010.
- [48] H. C. Berg. *Random walks in biology*. Princeton Univ Press, 1993.
- [49] Matthias Weiss, Markus Elsner, Fredrik Kartberg, and Tommy Nilsson. Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. *Biophysical journal*, 87(5):3518–24, 2004.
- [50] Margaret R Horton, Felix Höfling, Joachim O Radler, and Thomas Franosch. Development of anomalous diffusion among crowding proteins. *Soft Matter*, 6(12):2648–2656, 2010.
- [51] Felix Höfling and Thomas Franosch. Anomalous transport in the crowded world of biological cells. *Reports on Progress in Physics*, 76(4):046602, 2013.
- [52] Olivia Stiehl, Kathrin Weidner-Hertrampf, and Matthias Weiss. Macromolecular crowding impacts on the diffusion and conformation of DNA hairpins. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 91(1):1–6, 2015.

- [53] Matthias Weiss, Hitoshi Hashimoto, and Tommy Nilsson. Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 84(6):4043–4052, 2003.
- [54] Rainer Klages, G. (Guenter) Radons, and Igor M. Sokolov. *Anomalous transport: foundations and applications*. Wiley-VCH, 2008.
- [55] A Ott, J P Bouchaud, D Langevin, and W Urbach. Anomalous Diffusion in Living Polymers: A Genuine Levy Flight? *Physical Review Letters*, 65(17):2201–2204, 1990.
- [56] Michael J Saxton. A Biological Interpretation of Transient Anomalous Subdiffusion. I. Qualitative Model. *Biophysj*, 92(4):1178–1191, 2007.
- [57] Nicolas Destainville, Aude Saulière, and Laurence Salomé. Comment to the Article by Michael J. Saxton: A Biological Interpretation of Transient Anomalous Subdiffusion. I. Qualitative Model. *Biophysical Journal*, 95(7):3117–3119, 2008.
- [58] J R Lepock, K H Cheng, S D Campbell, and A Kruvv. Rotational diffusion of TEMPONE in the cytoplasm of Chinese hamster lung cells. *Biophysical journal*, 44(3):405–12, 1983.
- [59] Andrea M Mastro, Michael A Babich, William D Taylor, and Alec D Keith. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(June):3414–3418, 1984.
- [60] A. M. Mastro and A. D. Keith. Diffusion in the aqueous compartment. *Journal of Cell Biology*, 99(1 II), 1984.
- [61] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Berlin, 3rd edition, 2007.
- [62] Valentin Magidson and Alexey Khodjakov. Circumventing photodamage in live-cell microscopy. *Methods in Cell Biology*, 114:545–560, 2013.
- [63] Adam M. Rainey and Michael W. Davidson. Yokogawa Spinning Disk Scanning Unit.
- [64] H. Siedentopf and R. Zsigmondy. Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Annalen der Physik*, 315(1):1–39, 1903.
- [65] A. H. Voie, D. H. Burns, and F. A. Spelman. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *Journal of Microscopy*, 170(3):229–236, jun 1993.
- [66] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H.K. K Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686):1007–1009, 2004.
- [67] Peter J Verveer, Jim Swoger, Francesco Pampaloni, Klaus Greger, Marco Marcello, and Ernst H K Stelzer. High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nature Methods*, 4(4):311–313, 2007.
- [68] Philipp J. Keller, Annette D. Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst H.K. K Stelzer. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5904):1065–1069, 2008.



- [69] J. Huisken and D. Y. R. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12):1963–1975, 2009.
- [70] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Anthony Santella, Khaled Khairy, Zhirong Bao, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nature Methods*, 7(8):637–642, 2010.
- [71] Uros Krzic, Stefan Gunther, Timothy E Saunders, Sebastian J Streichan, and Lars Hufnagel. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nature Methods*, 9(7):730–733, 2012.
- [72] Philipp J Keller and Hans-Ulrich Dodt. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(1):138–143, 2012.
- [73] Eugen Baumgart and Ulrich Kubitscheck. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Optics Express*, 20(19):21805–21814, 2012.
- [74] Yicong Wu, Peter Wawrzusin, Justin Senseney, Robert S Fischer, Ryan Christensen, Anthony Santella, Andrew G York, Peter W Winter, Clare M Waterman, Zhirong Bao, Daniel A Colón-Ramos, Matthew McAuliffe, and Hari Shroff. Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy. *Nature Biotechnology*, 31(11):1032–1038, 2013.
- [75] B.-C. Chen, Wesley R. Legant, K. Wang, Lin Shao, Daniel E. Milkie, Michael W. Davidson, Chris Janetopoulos, Xufeng S. Wu, J. A. Hammer, Zhe Liu, Brian P. English, Y. Mimori-Kiyosue, Daniel P. Romero, Alex T. Ritter, J. Lippincott-Schwartz, L. Fritz-Laylin, R. Dyche Mullins, Diana M. Mitchell, A.-C. Reymann, Joshua N. Bembenek, R. Bohme, Stephan W. Grill, Jennifer T. Wang, Geraldine Seydoux, U. Serdar Tulu, Daniel P. Kiehart, Eric Betzig, A.-C. Reymann, R. Bohme, Stephan W. Grill, Jennifer T. Wang, Geraldine Seydoux, U. Serdar Tulu, Daniel P. Kiehart, and Eric Betzig. Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science*, 346(6208):1257998–1257998, 2014.
- [76] Tom Vettenburg, Heather I C Dalgarno, Jonathan Nylk, Clara Coll-Lladó, David E K Ferrier, Tomáš Cizmar, Frank J Gunn-Moore, and Kishan Dholakia. Light-sheet microscopy using an Airy beam. *Nature methods*, 11(5):541–4, 2014.
- [77] Gustavo de Medeiros, Nils Norlin, Stefan Gunther, Marvin Albert, Laura Panavaite, Ulla-Maj Fiuza, Francesca Peri, Takashi Hiragi, Uros Krzic, and Lars Hufnagel. Confocal multiview light-sheet microscopy. *Nature communications*, 6:8881, 2015.
- [78] Philipp Struntz. *Automatisierung und Charakterisierung eines Lichtblattmikroskops zur Beobachtung entwicklungsbiologischer Modellsysteme*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, 2013.
- [79] Rory M. Power and Jan Huisken. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nature Methods*, 14(4):360–373, 2017.
- [80] Robert H. Webb. Theoretical basis of confocal microscopy. *Methods in Enzymology*, 307:3–20, 1999.
- [81] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 7th edition, 1999.

- [82] Michael Weber and Jan Huiskens. Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(5):566–572, 2011.
- [83] Jörg G Ritter, Roman Veith, Jan-Peter Siebrasse, and Ulrich Kubitscheck. High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy. *Optics express*, 16(10):7142–7152, 2008.
- [84] Colin J. R. Sheppard. Superresolution in confocal Imaging. *Optik*, 80(2):53 – 54, 1988.
- [85] Claus B. Müller and Jörg Enderlein. Image scanning microscopy. *Physical Review Letters*, 104(19):1–4, 2010.
- [86] Olaf Schulz, Christoph Pieper, Michaela Clever, Janine Pfaff, Aike Ruhlandt, Ralph H Kehlenbach, Fred S Wouters, Jörg Großhans, Gertrude Bunt, and Jörg Enderlein. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52):21000–5, 2013.
- [87] Colin J R Sheppard, Shalin B Mehta, and Rainer Heintzmann. Superresolution by image scanning microscopy using pixel reassignment. *Optics letters*, 38(15):2889–92, 2013.
- [88] Andrew G. York, Sapun H. Parekh, Damian Dalle Nogare, Robert S. Fischer, Kelsey Temprine, Marina Mione, Ajay B. Chitnis, Christian A. Combs, and Hari Shroff. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Nature Methods*, 9(7):749–754, 2012.
- [89] Peter W. Winter, Andrew G. York, Damian Dalle Nogare, Maria Ingaramo, Ryan Christensen, Ajay Chitnis, George H. Patterson, and Hari Shroff. Two-photon instant structured illumination microscopy improves the depth penetration of super-resolution imaging in thick scattering samples. *Optica*, 1(3):181, 2014.
- [90] M. Ingaramo, A. G. York, P. Wawrzusin, O. Milberg, A. Hong, R. Weigert, H. Shroff, and G. H. Patterson. Two-photon excitation improves multifocal structured illumination microscopy in thick scattering tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14):5254–5259, 2014.
- [91] Ingo Gregor, Martin Spiecker, Roman Petrovsky, Jörg Großhans, Robert Ros, and Jörg Enderlein. Rapid nonlinear image scanning microscopy. *Nature Methods*, 14(11), 2017.
- [92] Douglas Magde, Elliot Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, 1972.
- [93] E L Elson and D Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13:1–27, 1974.
- [94] James Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 2006.
- [95] Petra Schwille and Elke Haustein. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. *Doi:10.1002/Lpor.200910041*, 94:1–33, 2009.
- [96] Qiaoqiao Ruan, Melanie A Cheng, Moshe Levi, Enrico Gratton, and William W Mantulin. Spatial-temporal studies of membrane dynamics: scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS). *Biophysical Journal*, 87(2):1260–1267, 2004.

- [97] Jonas Ries, Salvatore Chiantia, and Petra Schwille. Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS. *Biophysical Journal*, 96(5):1999–2008, 2009.
- [98] Michelle A Digman, Parijat Sengupta, Paul W Wiseman, Claire M Brown, Alan R Horwitz, and Enrico Gratton. Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope: exploiting the hidden time structure. *Biophysical journal*, 88(5):L33–6, 2005.
- [99] Daniel R Sisan, Richard Arevalo, Catherine Graves, Ryan McAllister, and Jeffrey S Urbach. Spatially Resolved Fluorescence Correlation Spectroscopy Using a Spinning Disk Confocal Microscope. *Biophysical Journal*, 91(11):4241–4252, 2006.
- [100] Thorsten Wohland, Xianke Shi, Jagadish Sankaran, and Ernst H K Stelzer. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. *Optics express*, 18(10):10627–41, 2010.
- [101] Jérémie Capoulade, Malte Wachsmuth, Lars Hufnagel, and Michael Knop. Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells. *Nature Biotechnology*, 29(9):835–839, 2011.
- [102] Jan Wolfgang Krieger, Anand Pratap Singh, Christoph S Garbe, Thorsten Wohland, and Jörg Langowski. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS). *Optics express*, 22(3):2358–75, 2014.
- [103] Philipp Struntz and Matthias Weiss. Multiplexed measurement of protein diffusion in *Caenorhabditis elegans* embryos with SPIM-FCS. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(4):044002, 2016.
- [104] Anand P. Singh, Rémi Galland, Megan L. Finch-Edmondson, Gianluca Greci, Jean-Baptiste Sibarita, Vincent Studer, Virgile Viasnoff, and Timothy E. Saunders. 3D Protein Dynamics in the Cell Nucleus. *Biophysical Journal*, 112(1):133–142, 2017.
- [105] Alena M Lieto and Nancy L Thompson. Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy: nonfluorescent competitors. *Biophysical journal*, 87(2):1268–78, 2004.
- [106] Anand Pratap Singh, Jan Wolfgang Krieger, Jan Buchholz, Edoardo Charbon, Jörg Langowski, and Thorsten Wohland. The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy. *Optics express*, 21(7):8652–68, 2013.
- [107] Jan W. Krieger, Anand P. Singh, Nirmalya Bag, Christoph S. Garbe, Timothy E. Saunders, Jörg Langowski, and Thorsten Wohland. Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms. *Nature protocols*, 10(12):1948–74, 2015.
- [108] Radek Machan, Yong Hwee Foo, and Thorsten Wohland. On the Equivalence of FCS and FRAP: Simultaneous Lipid Membrane Measurements. *Biophysical Journal*, 111(1):152–161, 2016.
- [109] H. Qian, M.P. P. Sheetz, and E.L. L. Elson. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 60(4):910–921, 1991.
- [110] Hugo Geerts, Mark D E Brabander, Ronny Nuydens, Staf Geuens, Mark Moeremans, J A N D E Mey, Peter Hollenbeck, M. De Brabander, Ronny Nuydens, Staf Geuens, Mark Moeremans, J. De Mey, and Peter Hollenbeck. Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophysical Journal*, 52(5):775–782, 1987.

- [111] Jörg Gerhard Ritter, Roman Veith, Andreas Veenendaal, Jan Peter Siebrasse, and Ulrich Kubitscheck. Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue. *PLoS ONE*, 5(7):1–9, 2010.
- [112] Roberto Cerbino and Veronique Trappe. Differential dynamic microscopy: Probing wave vector dependent dynamics with a microscope. *Physical Review Letters*, 100(18):1–4, 2008.
- [113] Fabio Giavazzi, Dorian Brogioli, Veronique Trappe, Tommaso Bellini, and Roberto Cerbino. Scattering information obtained by optical microscopy: Differential dynamic microscopy and beyond. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 80(3):1–15, 2009.
- [114] Fabio Giavazzi and Roberto Cerbino. Digital Fourier microscopy for soft matter dynamics. *Journal of Optics*, 16(8):083001, 2014.
- [115] S B Dubin, J H Lunacek, and G B Benedek. Observation of the spectrum of light scattered by solutions of biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(5):1164–1171, 1967.
- [116] Peter J. Lu, Fabio Giavazzi, Thomas E. Angelini, Emanuela Zaccarelli, Frank Jargstorff, Andrew B. Schofield, James N. Wilking, Mark B. Romanowsky, David A. Weitz, and Roberto Cerbino. Characterizing concentrated, multiply scattering, and actively driven fluorescent systems with confocal differential dynamic microscopy. *Physical Review Letters*, 108(21):1–5, 2012.
- [117] Devynn M Wulstein, Kathryn E Regan, Rae M Robertson-Anderson, and Ryan McGorty. Light-sheet microscopy with digital Fourier analysis measures transport properties over large field-of-view. *Optics Express*, 24(18):20881, 2016.
- [118] Vincent A. Martinez, Rut Besseling, Ottavio A. Croze, Julien Tailleur, Mathias Reufer, Jana Schwarz-Linek, Laurence G. Wilson, Martin A. Bees, and Wilson C. K. Poon. Differential dynamic microscopy: A high-throughput method for characterizing the motility of microorganisms. *Biophysical Journal*, 103(8):1637–1647, 2012.
- [119] Jana Schwarz-Linek, Jochen Arlt, Alys Jepson, Angela Dawson, Teun Vissers, Dario Miroli, Teuta Pilizota, Vincent A. Martinez, and Wilson C K Poon. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Escherichia coli as a model active colloid : A practical introduction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137:2–16, 2016.
- [120] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9):1055–1069, 1976.
- [121] Matthias Weiss. Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic*, 5(9):662–671, 2004.
- [122] D.M. M. Soumpasis. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*, 41(1):95–97, 1983.
- [123] J C Bulinski, D J Odde, B J Howell, T D Salmon, and C M Waterman-Storer. Rapid dynamics of the microtubule binding of ensconsin in vivo. *Journal of cell science*, 114(Pt 21):3885–3897, 2001.

- [124] Julia Hoffmann, Rolf Fickentscher, and Matthias Weiss. Influence of organelle geometry on the apparent binding kinetics of peripheral membrane proteins. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 91(2):1–7, 2015.
- [125] Hellen C. Ishikawa-Ankerhold, Richard Ankerhold, and Gregor P C Drummen. Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 17(4):4047–4132, 2012.
- [126] Sergej Tschachotin. Die Mikroskopische Strahlenstichmethode, Eine Zelloperationsmethode. *Biol. Zentralbl*, 1912.
- [127] Valentin Magidson and Alexey Khodjakov. Laser Microsurgery in the GFP Era. *Methods in Cell Biology*, 11(06):1–26, 2008.
- [128] Alexey Khodjakov, Richard W. Cole, and Conly L. Rieder. A synergy of technologies: Combining laser microsurgery with green fluorescent protein tagging. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 38(4):311–317, 1997.
- [129] Markhof H. Niemz. *Laser-Tissue Interactions*. Springer, 1996.
- [130] Stephan W. Grill, Jonathon Howard, Erik Schäffer, Ernst H K Stelzer, and Anthony a Hyman. The Distribution of Active Force Generators Controls Mitotic Spindle Position. *Science*, 301(5632):518–521, 2003.
- [131] Alfred Vogel and Vasan Venugopalan. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chem. Rev.*, 103(2):577–644, 2003.
- [132] Philbert S. Tsai, Pablo Blinder, Benjamin J. Migliori, Joseph Neev, Yishi Jin, Jeffrey A. Squier, and David Kleinfeld. Plasma-mediated ablation: an optical tool for submicrometer surgery on neuronal and vascular systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(1):90–99, 2009.
- [133] Christopher Fang-Yen. Laser Microsurgery in *Caenorhabditis elegans*. pages 177–206, 2013.
- [134] H Hutter and R Schnabel. glp-1 and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 120(7):2051–2064, 1994.
- [135] Julien Colombelli, Emmanuel G. Reynaud, and E. H K Stelzer. Investigating Relaxation Processes in Cells and Developing Organisms: From Cell Ablation to Cytoskeleton Nanosurgery. *Methods in Cell Biology*, 82(06):267–291, 2007.
- [136] Michael Schaub. *Aufbau eines Lichtblattmikroskops (SPIM)*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, 2012.
- [137] Lukas Weihmayr. *Aufbau eines Lichtblattmikroskops zur Implementierung von Differential Dynamic Microscopy*. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth, 2017.
- [138] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682, 2012.

- [139] Caroline A. Schneider, Wayne S. Rasband, and Kevin W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671–675, 2012.
- [140] Abhishek Kumar, Yicong Wu, Ryan Christensen, Panagiotis Chandris, William Gandler, Evan McCreedy, Alexandra Bokinsky, Daniel A Colón-Ramos, Zhirong Bao, Matthew McAuliffe, Gary Rondeau, and Hari Shroff. Dual-view plane illumination microscopy for rapid and spatially isotropic imaging. *Nature Protocols*, 9(11):2555–2573, 2014.
- [141] Dirk Hofmann. *Orts- und zeitaufgelöste Diffusionsmessungen im frühen Embryo von Caenorhabditis elegans*. Masterarbeit, Universität Bayreuth, 2017.
- [142] Jan Wolfgang Krieger and Jörg Langowski. Quickfit 3.0 (status: beta, , compiled: 2015-10-29, SVN: 4465): A data evaluation application for biophysics, 2015.
- [143] Arthur D Edelstein, Mark A Tsuchida, Nenad Amodaj, Henry Pinkard, Ronald D Vale, and Nico Stuurman. Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software. *Journal of Biological Methods*, 1(2):10, 2014.
- [144] K Kinoshita, H Itoh, S Ishiwata, K Hirano, T Nishizaka, and T Hayakawa. Dual-view microscopy with a single camera - real-time imaging of molecular orientation and calcium. *J. Cell Biol.*, 115(1):67–73, 1991.
- [145] Rolf Fickentscher and Matthias Weiss. Physical determinants of asymmetric cell divisions in the early development of *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, (August):1–10, 2017.
- [146] L G Edgar and J D McGhee. DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell*, 53(4):589–99, 1988.
- [147] Nisha Pawar, Claudia Donth, and Matthias Weiss. Anisotropic diffusion of macromolecules in the contiguous nucleocytoplasmic fluid during eukaryotic cell division. *Current Biology*, 24(16):1905–1908, 2014.
- [148] Jagadish Sankaran, Nirmalya Bag, Rachel Susan Kraut, and Thorsten Wohland. Accuracy and precision in camera-based fluorescence correlation spectroscopy measurements. *Analytical Chemistry*, 85:3948–3954, 2013.
- [149] Laure Wawrezinieck, Hervé Rigneault, Didier Marguet, and Pierre-François François Lenne. Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Laws to Probe the Submicron Cell Membrane Organization. *Biophysical Journal*, 89(6):4029–4042, 2005.
- [150] Xue Wen Ng, Nirmalya Bag, Thorsten Wohland, Xue Wen, Nirmalya Bag, and Thorsten Wohland. Characterization of Lipid and Cell Membrane Organization by the Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Law. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 69(3):112–119, 2015.
- [151] Takanori Kihara, Junri Ito, and Jun Miyake. Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS ONE*, 8(11), 2013.
- [152] Nirmalya Bag, Jagadish Sankaran, Alexandra Paul, Rachel S. Kraut, and Thorsten Wohland. Calibration and limits of camera-based fluorescence correlation spectroscopy: A supported lipid bilayer study. *ChemPhysChem*, 13(11):2784–2794, 2012.

- [153] Jean-Yves Yves Tinevez, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M. Hoopes, Gregory D. Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y. Bednarek, Spencer L. Shorte, and Kevin W. Eliceiri. TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115:80–90, 2016.
- [154] Nadine Tarantino, Jean Yves Tinevez, Elizabeth Faris Crowell, Bertrand Boisson, Ricardo Henriques, Musa Mhlanga, Fabrice Agou, Alain Israël, and Emmanuel Laplantine. Tnf and il-1 exhibit distinct ubiquitin requirements for inducing NEMO-IKK supramolecular structures. *Journal of Cell Biology*, 204(2):231–245, 2014.
- [155] Douglas S. Martin, Martin B. Forstner, and Josef A. Käs. Apparent Subdiffusion Inherent to Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*, 83(4):2109–2117, 2002.
- [156] Mark Goulian and Sanford M Simon. Tracking Single Proteins within Cells. *Biophysical journal*, 79(4):2188–2198, 2010.
- [157] Thierry Savin and Patrick S. Doyle. Static and Dynamic Errors in Particle Tracking Microrheology. *Biophysical Journal*, 88(1):623–638, 2005.
- [158] Alexandra V. Bayles, Todd M. Squires, and Matthew E. Helgeson. Dark-field differential dynamic microscopy. *Soft Matter*, 12(8):2440–2452, 2016.
- [159] David Germain, Mathieu Leocmach, and Thomas Gibaud. Differential dynamic microscopy to characterize Brownian motion and bacteria motility. *American Journal of Physics*, 84(3):202–210, 2016.
- [160] Maik Drechsler, Fabio Giavazzi, Roberto Cerbino, and Isabel M Palacios. Active diffusion and advection in the Drosophila ooplasm result from the interplay of the actin and microtubule cytoskeletons. *bioRxiv*, page 098590, 2017.
- [161] L. G. Wilson, V. A. Martinez, J. Schwarz-Linek, J. Tailleur, G. Bryant, P. N. Pusey, and W. C K Poon. Differential dynamic microscopy of bacterial motility. *Physical Review Letters*, 106(1):7–10, 2011.
- [162] Lili Liu, Xiaoshu Cai, Jie Zhang, and Chengze Xu. Particle-size measurements in a micro-channel with image dynamic light scattering method. *Procedia Engineering*, 102:904–910, 2015.
- [163] Gerald R V Hammond, Yirong Sim, Leon Lagnado, and Robin F. Irvine. Reversible binding and rapid diffusion of proteins in complex with inositol lipids serves to coordinate free movement with spatial information. *Journal of Cell Biology*, 184(2):297–308, 2009.
- [164] Nathan W. Goehring, Debanjan Chowdhury, Anthony A. Hyman, and Stephan W. Grill. FRAP analysis of membrane-associated proteins: Lateral diffusion and membrane-cytoplasmic exchange. *Biophysical Journal*, 99(8):2443–2452, 2010.
- [165] G. Seydoux, C. C. Mello, J. Pettitt, W. B. Wood, J. R. Priess, and A. Fire. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*, 1996.
- [166] C. Tenenhaus, K. Subramaniam, M. A. Dunn, and G. Seydoux. PIE-1 is a bifunctional protein that regulates maternal and zygotic gene expression in the embryonic germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*, 15(8):1031–1040, 2001.

- [167] Cynthia Derenzo, Kimberly J Reese, and Geraldine Seydoux. Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin- dependent degradation. 424(6949):685–689, 2003.
- [168] Caroline A. Spike and Susan Strome. Germ Plasm: Protein Degradation in the Soma. *Current Biology*, 13(21):837–839, 2003.
- [169] Y. Wu, H. Zhang, and E. E. Griffin. Coupling between cytoplasmic concentration gradients through local control of protein mobility in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Molecular Biology of the Cell*, 26(17):2963–2970, 2015.
- [170] Adrian A Cuenca, Aaron Schetter, Donato Aceto, and Kenneth Kemphues. Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development*, 130(7):1255–1265, 2003.
- [171] Christopher M Gallo, Jennifer T Wang, Fumio Motegi, and Geraldine Seydoux. Cytoplasmic partitioning of P granule components is not required to specify the germline in *C. elegans*. *Science*, 330(6011):1685–1689, 2010.
- [172] Julien Colombelli, Stephan W. Grill, and E. H K Stelzer. Ultraviolet diffraction limited nanosurgery of live biological tissues. *Review of Scientific Instruments*, 75(2):2773, 2004.
- [173] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11):780, 1994.
- [174] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [175] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10):793–796, 2006.
- [176] S. Wolter, M. Schüttelpelz, M. Tscherepanow, S. Van De Linde, M. Heilemann, and M. Sauer. Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *Journal of Microscopy*, 237(1):12–22, 2010.
- [177] P. J. de Pablo, I. A.T. T. Schaap, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt. Deformation and Collapse of Microtubules on the Nanometer Scale. *Physical Review Letters*, 91(9):098101, 2003.
- [178] Valerii M. Sukhorukov, Daniel Dikov, Andreas S. Reichert, and Michael Meyer-Hermann. Emergence of the Mitochondrial Reticulum from Fission and Fusion Dynamics. *PLoS Computational Biology*, 8(10), 2012.
- [179] Sven Bauernfeind. *Rekonstruktion der Topologie mitochondrialer Netzwerke in Säugerzellen*. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth, 2013.
- [180] Csilla Maria Ferencz, Gernot Guigas, Andreas Veres, Brigitte Neumann, Olaf Stemmann, and Matthias Weiss. Shaping the endoplasmic reticulum in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(9):2035–2040, 2016.
- [181] Konstantin Speckner. *Dynamische und topologische Netzwerkeigenschaften des endoplasmatischen Retikulums*. Masterarbeit, Universität Bayreuth, 2017.



- [182] Nathan W. Goehring, Carsten Hoege, Stephan W. Grill, and Anthony A. Hyman. PAR proteins diffuse freely across the anterior-posterior boundary in polarized *C. elegans* embryos. *Journal of Cell Biology*, 193(3):583–594, 2011.
- [183] Robert D Phair, Paola Scaffidi, Cem Elbi, Jaromíra Vecerová, Anup Dey, Keiko Ozato, David T Brown, Gordon Hager, Michael Bustin, and Tom Misteli. Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 24(14):6393–6402, 2004.
- [184] J Ellenberg, E D Siggia, J E Moreira, C L Smith, J F Presley, H J Worman, and J Lippincott-Schwartz. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *The Journal of cell biology*, 138(6):1193–206, 1997.
- [185] Markus Elsner, Hitoshi Hashimoto, Jeremy C. Simpson, Dan Cassel, Tommy Nilsson, and Matthias Weiss. Spatiotemporal dynamics of the COPI vesicle machinery. *EMBO Reports*, 4(10):1000–1005, 2003.
- [186] Jared E. Toettcher, Christopher A. Voigt, Orion D. Weiner, and Wendell A. Lim. The promise of optogenetics in cell biology: Interrogating molecular circuits in space and time. *Nature Methods*, 8(1):35–38, 2011.
- [187] Yuki Tsukada and Ikue Mori. Optogenetics in *Caenorhabditis elegans*. In *Optogenetics*, pages 213–226. Springer Japan, Tokyo, 2015.
- [188] Andrew M. Leifer, Christopher Fang-Yen, Marc Gershow, Mark J. Alkema, and Aravinthan D T Samuel. Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods*, 8(2):147–152, 2011.
- [189] Hayretin Yumerefendi, Daniel J. Dickinson, Hui Wang, Seth P. Zimmerman, James E. Bear, Bob Goldstein, Klaus Hahn, and Brian Kuhlman. Control of protein activity and cell fate specification via light-mediated nuclear translocation. *PLoS ONE*, 10(6):1–19, 2015.
- [190] Kentaro Noma and Yishi Jin. Optogenetic mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 6:1–9, 2015.
- [191] Malgorzata Borowiak, Wallis Nahaboo, Martin Reynders, Katharina Nekolla, Pierre Jalinot, Jens Hasserodt, Markus Rehberg, Marie Delattre, Stefan Zahler, Angelika Vollmar, Dirk Trauner, and Oliver Thorn-Seshold. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell*, 162(2):402–411, 2015.
- [192] J.E. E. Sulston and J.G. G. White. Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 78(2):577–597, aug 1980.
- [193] R Schnabel. Cellular interactions involved in the determination of the early *C.elegans* embryo. *Mech. Devel.*, 34:85–100, 1991.
- [194] Bernd Junkersdorf and Einhard Schierenberg. Embryogenesis in *C. elegans* after elimination of individual blastomeres or induced alteration of the cell division order. *Roux’s Archives of Developmental Biology*, 202(1):17–22, 1992.

- [195] C. V. Gabel, F. Antoine, C.-F. Chuang, A. D. T. Samuel, and C. Chang. Distinct cellular and molecular mechanisms mediate initial axon development and adult-stage axon regeneration in *C. elegans*. *Development*, 135(21):3623–3623, 2008.
- [196] Einhard Schierenberg. Altered cell-division rates after laser-induced cell fusion in nematode embryos. *Developmental Biology*, 101(1):240–245, 1984.
- [197] Einhard Schierenberg and William B. Wood. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 107(2):337–354, 1985.
- [198] Einhard Schierenberg. Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 122(2):452–463, 1987.
- [199] JS Laufer and G von Ehrenstein. Nematode Development After Removal of Egg Cytoplasm: Absence of Localized Unbound Determinants. 211(January):402–405, 1981.
- [200] Einhard Schierenberg and Bernd Junkersdorf. The role of eggshell and underlying vitelline membrane for normal pattern formation in the early *C. elegans* embryo. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 202(1):10–16, 1992.
- [201] Susanne Kaitna, Heinke Schnabel, Ralf Schnabel, Anthony a Hyman, and Michael Glotzer. A ubiquitin C-terminal hydrolase is required to maintain osmotic balance and execute actin-dependent processes in the early *C. elegans* embryo. *Journal of cell science*, 115(Pt 11):2293–2302, 2002.
- [202] Tzu Ling Chen, Hung Chi Yang, Cheng Yu Hung, Meng Hsin Ou, Yi Yun Pan, Mei Ling Cheng, Arnold Stern, Szecheng J. Lo, and Daniel Tsun Yee Chiu. Impaired embryonic development in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient *Caenorhabditis elegans* due to abnormal redox homeostasis induced activation of calcium-independent phospholipase and alteration of glycerophospholipid metabolism. *Cell death & disease*, 8(1):e2545, 2017.
- [203] Kathryn K Stein and Andy Golden. The *C. elegans* eggshell. *WormBook*, pages 1–35, 2017.
- [204] Jen Yi Lee, Daniel J. Marston, Timothy Walston, Jeff Hardin, Ari Halberstadt, and Bob Goldstein. Wnt/Frizzled Signaling Controls *C. elegans* Gastrulation by Activating Actomyosin Contractility. *Current Biology*, 16(20):1986–1997, 2006.
- [205] Timothy Walston and Jeff Hardin. Laser Killing of Blastomeres in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(12), 2010.
- [206] Deepika Singh and Christian Pohl. Coupling of Rotational Cortical Flow, Asymmetric Midbody Positioning, and Spindle Rotation Mediates Dorsoventral Axis Formation in *C. elegans*. *Developmental Cell*, 28(3):253–267, 2014.
- [207] W. Nahaboo, M. Zouak, P. Askjaer, and M. Delattre. Chromatids segregate without centrosomes during *Caenorhabditis elegans* mitosis in a Ran- and CLASP-dependent manner. *Molecular Biology of the Cell*, 26(11):2020–2029, 2015.
- [208] Stephan W. Grill, Pierre Gönczy, Ernst H. K. Stelzer, and Anthony A. Hyman. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*, 409(6820):630–633, 2001.

- [209] Henrik Bringmann and Anthony A. Hyman. A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature*, 436(7051):731–734, 2005.
- [210] Jacques Pecreaux, Jens Christian Röper, Karsten Kruse, Frank Jülicher, Anthony A. Hyman, Stephan W. Grill, and Jonathon Howard. Spindle Oscillations during Asymmetric Cell Division Require a Threshold Number of Active Cortical Force Generators. *Current Biology*, 16(21):2111–2122, 2006.
- [211] Sebastian Krauß. *Quantifizierung der Korrelation von Teilungszeiten und Zellvolumina während der Embryogenese von Caenorhabditis elegans*. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth, 2017.
- [212] Sabine Mannherz. *Organellendynamik während der frühen Embryogenese von Caenorhabditis elegans*. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth, 2014.

## Wissenschaftliche Publikationen

1. R. Fickentscher\*, P. Struntz\*, M. Weiss  
**Mechanical Cues in the Early Embryogenesis of *Caenorhabditis elegans***  
Biophys. J., 105 (8), (2013), 1735-1736  
(\*gleichberechtigte Autoren)

*Diese Arbeit umfasst größtenteils Ergebnisse aus der Diplomarbeit des Autors dieser Arbeit [78] und einer weiteren Diplomarbeit durch Herrn Rolf Fickentscher [23].*

2. P. Struntz, M. Weiss  
**Multiplexed measurement of protein diffusion in *Caenorhabditis elegans* embryos with SPIM-FCS**  
J. Phys. D: Appl. Phys., 49 (4), (2016), 044002
3. R. Fickentscher, P. Struntz, M. Weiss  
**Setting the Clock for Fail-Safe Early Embryogenesis**  
Phys. Rev. Lett., 117, (2016), 188101

### *In Vorbereitung:*

1. P. Struntz, D. Hofmann, M. Weiss  
**PIE-1 and MEX-5 - A SPIM-FCS study**

*In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse aus Kapitel 7 sowie weitere Messungen im frühen Embryo im Kontext begleitender Simulationen vorgestellt werden.*

2. P. Struntz, M. Weiss  
**A comparison of quantitative diffusion measurement techniques for SPIM**

*Diese Arbeit soll einen Überblick über die in Kapitel 6 gezeigten Ergebnisse beinhalten.*

## Vorträge

1. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Mechanical cues during early embryogenesis of *C. elegans***  
Dynamic Days Europe, Bayreuth (2014)
2. P. Struntz, M. Weiss  
**Multiplexed measurement of protein diffusion in *Caenorhabditis elegans* embryos with SPIM-FCS**  
3rd Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference, Sheffield (2016)
3. P. Struntz, M. Weiss  
**Multiplexed measurement of protein diffusion in *Caenorhabditis elegans* embryos with SPIM-FCS**  
CMD26 - Condensed Matter in Groningen, Groningen (2016)
4. P. Struntz, D. Hofmann, M. Weiss  
**Exploring protein diffusion landscapes in living embryos with SPIM-FCS**  
DPG-Frühjahrstagung 2017, Dresden (2017)

## Application Notes

1. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss, S. Kleiner  
**Monitoring early embryogenesis via light sheet microscopy**  
sCMOS Camera Application Note, Hamamatsu (2013)
2. P. Struntz, M. Weiss, B. Eggart  
**Diffusion measurements in early C. elegans embryos using SPIM-FCS**  
Application Note, Hamamatsu (2016)
3. P. Struntz, M. Weiss, B. Eggart  
**Diffusion Measurements in Early C. Elegans Embryos**  
Imaging & Microscopy, Issue 2 (2016)

## Poster

1. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Monitoring early embryogenesis with single-plane illumination microscopy**  
DPG-Frühjahrstagung 2013, Regensburg (2013)
2. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Monitoring early embryogenesis with single-plane illumination microscopy**  
The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 - Quantitative Bioimaging, Okazaki (2013)
3. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Mechanical cues during early embryogenesis of C. elegans**  
DPG-Frühjahrstagung 2014, Dresden (2014)
4. P. Struntz, M. Weiss  
**SPIM applications in organismal biology**  
Biophysical approaches to understand life at different scales, Jülich (2014)
5. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**SPIM applications in organismal biology**  
DPG-Frühjahrstagung 2015, Berlin (2015)
6. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Illuminating dynamic processes in the embryogenesis of Caenorhabditis elegans with lightsheet microscopy**  
Physics of Living Matter 10, Cambridge (2015)
7. P. Struntz, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Illuminating dynamic processes in the embryogenesis of Caenorhabditis elegans with lightsheet microscopy**  
Biophysical Society 60th Annual meeting, Los Angeles (2016)
8. P. Struntz, M. Weiss  
**Quantitative diffusion measurements using light sheet microscopy**  
4th Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference, Singapur (2017)
9. P. Struntz, M. Weiss  
**A comparison of quantitative diffusion measurement techniques in a light sheet microscope**  
DPG-Frühjahrstagung 2018, Berlin (2018) - (EPL Poster Award 2018)

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Bayreuth, den

Philipp Struntz